

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-535146

(P2003-535146A)

(43) 公表日 平成15年11月25日 (2003. 11. 25)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード\* (参考)

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

Z 4 C 0 5 7

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 31/712

4 C 0 8 5

39/39

39/39

4 C 0 8 6

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 37/04

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2002-501476(P2002-501476)

(86) (22) 出願日 平成13年6月7日 (2001. 6. 7)

(85) 翻訳文提出日 平成14年12月6日 (2002. 12. 6)

(86) 国際出願番号 P C T / E P 0 1 / 0 6 4 3 3

(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 9 3 9 0 5

(87) 国際公開日 平成13年12月13日 (2001. 12. 13)

(31) 優先権主張番号 A 1 0 0 0 / 2 0 0 0

(32) 優先日 平成12年6月8日 (2000. 6. 8)

(33) 優先権主張国 オーストリア (A T)

(31) 優先権主張番号 A 1 9 7 3 / 2 0 0 0

(32) 優先日 平成12年11月23日 (2000. 11. 23)

(33) 優先権主張国 オーストリア (A T)

(71) 出願人 インターツェル・アクチエンゲゼルシャフト  
I N T E R C E L L A G

オーストリア、アー-1030 ヴィエナ、キャンパス・ヴィエナ・バイオセンター6番

(72) 発明者 ヴァルター・シュミット

オーストリア、アー-1030 ヴィエナ、シュタインガッセ18/10/1番

(72) 発明者 カレン・リングナウ

オーストリア、アー-1130 ヴィエナ、ガルガッセ8/10番

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外3名)

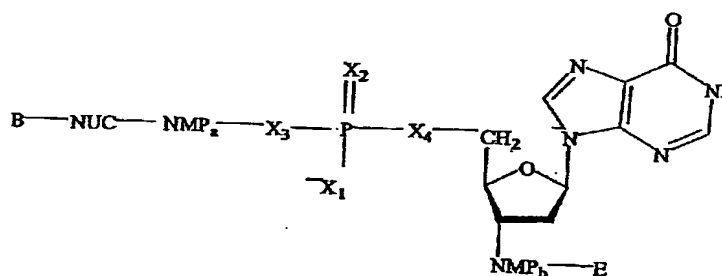
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫促進性オリゴデオキシヌクレオチド

(57) 【要約】

式 (I) :

\* 【化3】



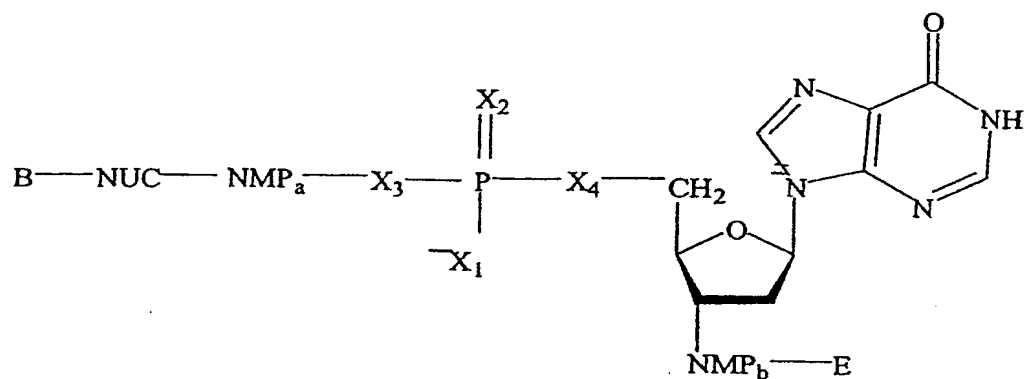
(式中、NMPはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチル-デオキシイノシンー、5-メチル-デオキシシトシンー、デオキシブソイドウリジンー、デオキシリボースプリンー、2-アミノ-デオキシリボースプリンー、6-S-デオキシグアニンー、2-ジメチル-デオキシグアノシンーまたはN-イソペンテニル-デオキシアデノシンーモノホスフェートまたはモノチオホス

フェートよりなる群から選ばれた2'デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、NUCは、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチル-デオキシイノシンー、5-メチル-デオキシシトシンー、デオキシブソイドウリジンー、デオキシリボースプリンー、2-アミノ-デオキシリボースプリンー、6-S-デオキシグアニンー、2-ジメチル-デオキシグアノシ

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(I)：

【化1】



(I)

(式中、XはいずれもOまたはS、

NMPはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチルデオキシイノシンー、5-メチルデオキシシトシンー、デオキシプソイドウリジンー、デオキシリボースプリンー、2-アミノデオキシリボースプリンー、6-S-デオキシグアニンー、2-ジメチルデオキシグアノシンーまたはN-イソペンテニルデオキシアデノシンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

NUCは、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチルデオキシイノシンー、5-メチルデオキシシトシンー、デオキシプソイドウリジンー、デオキシリボースプリンー、2-アミノデオキシリボースプリンー、6-S-デオキシグアニンー、2-ジメチルデオキシグアノシンーまたはN-イソペンテニルデオキシアデノシンよりなる群から選ばれた2'デオキシヌクレオシド、

aおよびbは0～100の整数であり、ただしa+bは4～150である、

BおよびEは核酸分子の5'末端または3'末端の一般的な基)  
の構造を有する免疫促進性のオリゴデオキシ核酸分子(ODN)。

【請求項2】 NMPが、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチル-デオキシイノシンー、5-メチル-デオキシシトシンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェートよりなる群から選ばれる、請求項1に記載のODN。

【請求項3】  $a+b$ が10~60、好ましくは15~40である、請求項1または2に記載のODN。

【請求項4】  $X_1$ および $X_2$ の少なくとも一方がSであり、 $X_3$ および $X_4$ の少なくとも一方がOであり、好ましくはNMPがいずれもヌクレオシドモノチオホスフェートである、請求項1ないし3のいずれかに記載のODN。

【請求項5】 下記配列：

h h h w d i d h h h、  
n h h h h h w d i n h h h h h h w n、  
n h h w d i d i n h h h h d i n d i n h、  
n h h h h h w d i d h h h h h h h h h w nまたは  
n h h w d i d i d h h h h d i d d i d h

(式中、nはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシシトシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

hはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシシトシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

iは、デオキシイノシンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

wはいずれも、デオキシアデノシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

dはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート)

を含む、請求項1ないし4のいずれかに記載のODN。

【請求項6】 2'-デオキシイノシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェートに3'側にて隣接した2'-デオキシシトシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェートを少なくとも一つ含む、請求項1ないし5のいずれかに記載のODN。

【請求項7】 下記配列：

g a c i t t、

i a c i t t、

g a i c t t、

i a i c t t

(式中、aはデオキシアデノシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート、

gはデオキシグアノシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート、

iはデオキシイノシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート、

cはデオキシシトシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート、

tはデオキシチミジンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート)

を含む、請求項1ないし6のいずれかに記載のODN。

【請求項8】 下記配列：

w d i、

w d i d、

w d i d i nまたは

w d i d i d

(式中、w、d、iおよびnは前記と同じ)

を含む、請求項1ないし7のいずれかに記載のODN。

【請求項9】 BおよびEが、-H、-CH<sub>3</sub>、-COH、-COCH<sub>3</sub>、-

OH、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{PO}_4$ 、 $-\text{PSO}_3$ 、 $-\text{PS}_2\text{O}_2$ 、 $-\text{PS}_3\text{O}$ 、 $-\text{PS}_4$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-\text{PO}_4-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{NH}_2$ または $-\text{PO}_4-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{NH}$ —標識よりなる群から独立に選ばれる、請求項1ないし8のいずれかに記載のODN。

【請求項10】 医薬、とりわけ免疫促進剤としての請求項1ないし9のいずれかに記載のODNの使用。

【請求項11】 請求項1ないし9のいずれかに記載のODNを含む医薬組成物。

【請求項12】 請求項1ないし9のいずれかに記載のODNおよび抗原を含む医薬組成物。

【請求項13】 さらにポリカチオン性ポリマー、好ましくはポリカチオン性ペプチド、とりわけポリアルギニン、ポリリシンまたは抗菌性ペプチド、とりわけカテリシジン由来の抗菌性ペプチド、または成長ホルモン、とりわけヒト成長ホルモンを含む、請求項11または12に記載の医薬組成物。

【請求項14】 さらに活性成分、とりわけサイトカイン、抗炎症性物質、抗菌性物質またはそれらの組み合わせを含む、請求項11ないし13のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項15】 さらに補助物質、とりわけ薬理学的に許容しうる担体、緩衝液物質、安定化剤またはそれらの組み合わせを含む、請求項11ないし14のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項16】 請求項1ないし9のいずれかに記載の1またはそれ以上のODNを $1\text{ ng}\sim 1\text{ g}$ 、好ましくは $100\text{ ng}\sim 10\text{ mg}$ 、とりわけ $10\text{ mg}\sim 1\text{ mg}$ 含む、請求項11ないし15のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項17】 ワクチンを調製するための請求項1ないし9のいずれかに記載のODNの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (技術分野)

本発明は、免疫促進性のオリゴデオキシ核酸分子（ODN）およびそのようなODNを含有する医薬組成物に関する。

## 【0002】

## (背景技術)

ワクチンは、他のいかなる医学的介入よりも多くの生命（および資源）を救うことができる（ノッサル（Nossal）、1998）。世界的なワクチン接種プログラムのおかげで多くの致死性疾患の発症率は急激に減少している。この見方は疾患の完成されたパネル（whole panel）、たとえば、結核、ジフテリア、百日咳、麻疹および破傷風にはあてはまるが、AIDSなどの大抵のウイルス感染症を含む多数の感染疾患に対する有効なワクチンは存在しない。また、感染性であるか非感染性であるかを問わず、マラリアおよび癌を含めて毎年何百万もの患者の何百万もの人命を奪う他の疾患に対するワクチンも存在しない。さらに、抗生物質に耐性の細菌および微生物の急激な出現は他の治療を要求しており、ワクチンは必然の選択となってきた。最後に、ワクチンに対する大いなる必要性はまた、心血管性疾患または癌または創傷よりもむしろ感染疾患が世界的に死亡および不具の最大の原因であるという事実によっても説明される（ブルーム（Bloom）およびウィダス（Widdus）、1998）。

## 【0003】

免疫学的な観点からの今日のワクチンの分野における1つの主要な問題は、伝統的なワクチン（および/またはこれら製剤に含まれる免疫変調化合物）が高レベルの抗体を誘発させるべくデザインされているということである（ハロウ（Harrow）およびレーン（Lane）、1988）。しかしながら、抗体自体は、ウイルス、細胞内細菌、ある種の寄生虫および癌によって引き起こされる大抵の病気を包含多数の疾患を防ぐうえでは有効ではない。そのような疾患の例は、これらに限られるわけではないが、上記HIVウイルスまたはマラリアの場合のPlasmodium種である。多くの実験系で、これら適応症には免疫系の体液性部門よりもむしろ

るT細胞を含む細胞性部門が重要であることが示されている。それゆえ、従来のワクチンの限界を克服する新規で革新的な技術が必要とされている。焦点は、抗原特異的なT細胞（病原感染細胞上に発現された分子を認識する）を含む細胞性の免疫系を信頼性をもって誘発する技術に対するものでなければならない。理想的には、ワクチンは、正常な細胞から病気になった細胞および/または感染した細胞を識別できるT細胞と、それと同時に細胞外面分中の病原体を認識するB細胞によって分泌される抗体との両者を誘発させるべくデザインされる。

#### 【0004】

幾つかの確立されたワクチンは、生きた弱毒化した微生物からなるが、ビルレントな野生株に逆戻りする危険が存在する。この点は、とりわけ免疫無防備状態の宿主では生命を脅かす筋書きともなりうる。別法として、ワクチンは病原体由来の抗原をこれら抗原に対する免疫応答を誘発もしくは促進する化合物（これら化合物は一般にアジュバントと呼ばれる）と組み合わせて投与される。なぜなら、これらサブユニットワクチン自体は一般に有効でないからである。

#### 【0005】

上記ワクチンが価値ある医学的治療であることに疑問はないわけであるが、その複合性ゆえに、たとえばワクチン接種した個体の細胞によって発現される分子と交差反応性を示すワクチンに含まれる抗原に対して重篤な副作用が惹起されうるという不利がある。さらに、規制当局、たとえば世界保健機構（WHO）、食品医薬品局（FDA）、およびそれらの対応ヨーロッパ部門による、ワクチンの組成および免疫の誘発機構の正確な記述に対する現存する要求は、満たすのが難しい。

#### 【0006】

抗原提示細胞は先天免疫系に属しており、先天免疫系は微生物への暴露後の初期に感染を制限する第一線の宿主防御として発展してきたものである（ホフマン（Hoffmann）ら、1999）。先天免疫系の細胞は、獲得免疫系によって認識される一層複雑で特異的な構造ではなく、標的に発現されたパターンないし比較的に非特異的な構造を認識する（ホフマン（Hoffmann）ら、1999）。先天免疫系の細胞の例はマクロファージおよび樹状細胞であるが、顆粒球（たとえば、

好中球)、ナチュラルキラー細胞その他もそうである。対照的に、獲得免疫系の細胞は、T細胞の場合にはペプチドを含む特異的で抗原性の構造を認識し、B細胞の場合にはペプチド並びに三次元構造を認識する。獲得免疫系は先天免疫系に比べてはるかに特異的で複雑であり、所定の病原体/抗原への暴露を繰り返すことにより改善される。

#### 【0007】

系統発生的には先天免疫系は遥かに古く、非常に原始的な生物において既に認めることができる。それにもかかわらず、先天免疫系は抗原暴露の初期相において重要である。というのは、病原体を封じ込める (containing) ことに加えて、先天免疫系の細胞、すなわちAPCは獲得免疫系の細胞の初回抗原刺激を受けさせ (prime)、かくして特異的な免疫応答を惹起して侵入者の排除に導くからである。要約すると、先天免疫系の細胞、とりわけAPCは、(a) 原始的なパターン認識系により感染を封じ込めること、および (b) 獲得免疫系の細胞に初回抗原刺激を受けさせて特異的な免疫応答および記憶に導き、侵入してきた病原体または他の標的の排除という結果となること、によって免疫応答の誘導相の際に重要な役割を果たしている (ロイット (Roitt) ら、1998)。これらメカニズムはまた、腫瘍細胞を排除または封じ込めるのにも重要である。

#### 【0008】

上記のように、先天免疫系の細胞は、その各標的に発現されたパターンを認識する。例を挙げると、グラム陰性細菌の場合のリポ多糖 (LPS)、ミコバクテリアの糖脂質、グラム陽性細菌のリポテイコ酸、酵母のマンナンおよびウイルスの二本鎖RNAである (ホフマン (Hoffmann) ら、1999)。さらに、先天免疫系の細胞は、腫瘍細胞上のタンパク質の変化したグリコシル化などのパターンを認識する。

最近の知見は、原生生物または下等真核生物のDNAを哺乳動物 (および、おそらく全てではないが大抵の脊椎動物) の先天免疫系 (しかしながら、おそらく獲得免疫系も) によって認識されるさらなるパターンとして記載している (クリーグ (Krieg)、1996; リップフォード (Lipford) ら、1998)。

#### 【0009】



免疫系は、細菌を含む下等生物を、おそらく病原体と宿主とのDNAの構造上および配列使用上の差異ゆえに認識する。とりわけ、非脊椎動物に由来するDNAの短いストレッチ、あるいはある種の塩基の前後関係での非メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチド (CpG) を含む短い合成ODNの形態のものが標的にされる (クリーグ (Krieg) ら、1995)。CpGモチーフは細菌DNAでは予想された頻度で見出されるが、脊椎動物DNAでは遥かに低い頻度でしか見出されない (リップロード (LipLord) ら、1998; ピゼツキー (Pisetsky)、1999)。さらに、非脊椎動物 (すなわち、細菌) のCpGモチーフはメチル化されていないのに対して脊椎動物のCpG配列はメチル化されている。これら細菌DNAと脊椎動物DNAとの差異は、脊椎動物が非脊椎動物のDNAを危険なシグナルとして認識することを可能にする。

#### 【0010】

天然のCpG含有DNA (ODN) 並びにCpGモチーフを含有しチオホスフェート置換 (ホスフェートをチオホスフェート残基と交換) されたODN (CpG-ODN) は、免疫細胞増殖および体液性免疫応答の強力なアクチベーターであるのみならず (クリーグ (Krieg) ら、1995)、強い細胞性免疫応答をも刺激する (リップフォード (Lipford) ら、1998に概説)。非メチル化CpGモチーフを含むDNA/ODNは、単球 (樹状細胞、マクロファージ) およびB細胞を直接活性化することができる。同様に、ナチュラルキラー (NK) 細胞は直接には活性化されないが、単球由来のIL-12 (インターロイキン12) に応答し、そのIFN- $\gamma$  産生は顕著に増大している (チェイス (Chace) ら、1997)。その結果、CpG DNAによる単球およびNK細胞の誘発は、Th1型応答の誘導および細胞障害性T細胞の発生を促進する。

#### 【0011】

ポリイノシン-ポリシチジン酸 (ポリI:C) などのようなイノシンおよびシトシンに基づくリボ核酸は、Th1特異的な免疫応答を促進することが知られている。イノシンおよびシトシンに基づくリボ核酸はIL-1 $\alpha$  およびIL-12などのサイトカインを産生するようにマクロファージを刺激することが知られており (マネッティ (Manetti) ら、1995)、強力な1型インターフェロンの

インデューサー（マネッティ（Manetti）ら、1995）および強力なNK細胞スティミュレーター（カバノー（Cavanaugh）ら、1996）としても知られている。

しかしながら、この作用はイノシンおよびシトシン残基を含むリボ核酸に厳格に限られている（WO98/16247）。

#### 【0012】

（発明の開示）

（発明が解決しようとする技術的課題）

本発明の発明者らによる研究は、非メチル化CpGモチーフを含むODNは免疫系を刺激するうえで有効であるが、本質的な欠点、とりわけ特異性（高いバックグラウンド）および高い全身的なTNF- $\alpha$ 産生などの副作用に関する欠点を有することを示している。高い全身的なTNF- $\alpha$ 放出はトキシックショック症候群を引き起こすことが知られており、これは患者の死を引き起こしうるものである。

#### 【0013】

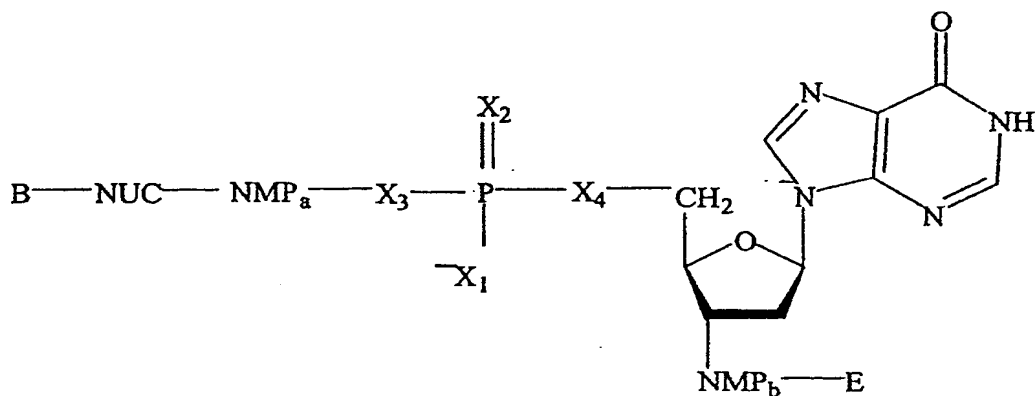
（その解決方法）

それゆえ、本発明の目的は、そのようなCpG配列に基づくODNのような激しい副作用を有することのない適当な新規なODNを提供することである。さらに、本発明の目的は、知られたODNを含有する医薬組成物の副作用を低減すること、および動物、とりわけヒトを含む哺乳動物のワクチン接種に適した有効な免疫促進特性を備えた、安全かつ有効な十分に許容できる（well-tolerable）医薬組成物を提供することである。

#### 【0014】

この目的は、式（I）：

【化2】



(I)

(式中、XはいずれもOまたはS、

NMPはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチルーデオキシイノシンー、5-メチルーデオキシシトシンー、デオキシプソイドウリジンー、デオキシリボースプリンー、2-アミノ-デオキシリボースプリンー、6-S-デオキシグアニンー、2-ジメチルーデオキシグアノシンーまたはN-イソペンテニルーデオキシアデノシンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

NUCは、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチルーデオキシイノシンー、5-メチルーデオキシシトシンー、デオキシプソイドウリジンー、デオキシリボースプリンー、2-アミノ-デオキシリボースプリンー、6-S-デオキシグアニンー、2-ジメチルーデオキシグアノシンーまたはN-イソペンテニルーデオキシアデノシンよりなる群から選ばれた2'デオキシヌクレオシド、

aおよびbは0～100の整数であり、ただしa+bは4～150である、

BおよびEは核酸分子の5'末端または3'末端の一般的な基)

の構造を有する免疫促進性のオリゴデオキシ核酸分子(ODN)によって解決される。

## 【0015】

驚くべきことに、デオキシイノシン残基を含むODN (I-ODN) がCpGモチーフを含むODNに匹敵する、または多くの場合CpGモチーフを含むODNよりも良好な免疫促進作用を示すことがわかった。さらに、本発明によるODNは、CpG ODNに比べて一層特異的な免疫応答を所定の抗原または抗原フラグメントに対して産生する。加えて、本発明によるODNは、有害な副作用の誘発、とりわけ全身的なTNF- $\alpha$ またはIL-6の誘発が低減している。

ポリ-ICすなわちWO98/16247において言及された分子などのようなイノシン含有RNA分子についてある種の免疫促進作用が記載されているが、驚くべきことにデオキシイノシン残基を含むデオキシ核酸分子が良好な免疫促進性のODNであることがわかった。

## 【0016】

さらに、本発明によるI-ODNは、特定のCpGモチーフに基づくODNとは対照的に、CpGオリゴヌクレオチドについて記載されているような（たとえば、EP0468520A2、WO96/02555、WO98/18810、WO98/37919、WO98/40100、WO98/52581、WO99/51259およびWO99/56755（すべて参照のため本明細書中に引用する）を参照）特定のモチーフまたはパリンドローム配列には依存しない。それゆえ、本発明によるI-ODNの一つの群はCIモチーフを含んでいるのが好ましい（それゆえ、これら引用した文献に記載されたODNのうちでも1またはそれ以上のグアノシン残基がデオキシイノシン残基で置換されているものは本発明のODNの好ましい態様である）。CIモチーフはその主たる免疫促進特性には必要ではない、というのはCIまたはICの文脈中にイノシンが位置していないI-ODNもまた免疫促進特性を示すからである。

## 【0017】

それゆえ、本発明によるI-ODNはデオキシイノシン残基を含むDNA分子であり、一本鎖の形態で提供されるのが好ましい。

本発明によるI-ODNは、組換え法により単離するかまたは化学的に合成することができる。後者の場合、本発明によるI-ODNはまた修飾したオリゴヌ

クレオチドを含んでいてよく、そのような修飾したオリゴヌクレオチドは、メチルホスホネートや他のリンベースの修飾オリゴヌクレオチド、たとえば、ホスホトリエステル、ホスホアミデートおよびホスホロジチオレートなどの標準的な化学変換を用いて合成することができる。しかしながら、他の非リンベースの修飾オリゴヌクレオチドを用いることができ（スターチャック（Stirchak）ら、3月17日（1989）、6129-6141）、モノホスフェートまたはモノチオホスフェートが本発明に使用するのに好ましい2'デオキシヌクレオシドモノホスフェートである。

#### 【0018】

本発明によるI-ODNのNMPは、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシイノシンー、デオキシシトシンー、デオキシウリジンー、デオキシチミジンー、2-メチルデオキシイノシンー、5-メチルデオキシシトシンーモノホスフェートまたはモノチオホスフェート（通常通り、ホスフェート基またはチオホスフェート基はデオキシリボースの5'である）よりなる群から選ばれるのが好ましい。CpGモチーフに基づくODNでは該モチーフがメチル化されていないことが必須であるが、驚くべきことに、このことは本発明によるODNの場合には当てはまらない。というのも、たとえば2-メチルデオキシイノシンや5-メチルデオキシシトシン残基は本発明によるODNの免疫促進特性に対していかなる一般的な悪影響をも及ぼさないからである。代わりに、NMPの2-デオキシ形に代えて、他のとりわけ不活性な基、たとえば、-F、-NH<sub>2</sub>、-CH<sub>3</sub>など、特に-CH<sub>3</sub>がリボース基の2'位に位置していてよい。もちろん、-OHおよびSH基は、リボース、とりわけイノシンNMPについてのリボース残基の2'位に存在することは本発明によるI-ODNでは排除される。

#### 【0019】

本発明によるODNの長さは、従来技術に従って使用される標準ODNの範囲内である。それゆえ、4未満および150を超える全長の分子は徐々に低下した免疫促進能を示す。好ましいODNは10～60、とりわけ15～40の塩基（ヌクレオシド）を含み、これはこれら好ましい態様において式I中のa+bが1

0～60、好ましくは15～40であることを意味する。

これに対して、従来技術で免疫促進性であるとして記載されているイノシンおよびシチジン含有リボ核酸分子は、分子量が200,000を遥かに超える大きくて比較的定められていないポリ核酸であった（Sigma Chemicalsより市販されているポリイノシンーポリシチジン酸の分子量は220,000～460,000（少なくとも500～1000のC+I残基）の範囲である）。本発明による分子は遥かに長さが短く、長さおよび組成がよく定められたDNA分子であり、製品における再現性の高いものである。

#### 【0020】

さらに、式Iで示されるI-ODNのデオキシイノシン含有NMPが1～4の硫黄原子を有するモノチオホスフェートであり、他のNMP、とりわけ他の全てのNMPがヌクレオシドモノチオホスフェートとして存在するのが好ましい。なぜなら、そのようなODNは一層高いヌクレアーゼ耐性を示すからである（本発明において「モノチオホスフェート」中の「モノ」はホスフェートに関するものであること、すなわち各NMP中に1つのホスフェート基（1つのリン原子）が存在することは明らかである）。好ましくは、本発明によるNMPにおいて、X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>の少なくとも一方はSであり、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>の少なくとも一方はOである。好ましくは、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>はOである（X<sub>3</sub>は、（NMPの合成のために）、たとえばホスフェート基からまたはNMPーリボースの3'基から由来するものであってよい）。

#### 【0021】

好ましくは、本発明によるODNは下記配列を含む：

hhh wdi dhhh、  
 nhh hhh wdi nhh hhh hhh wn、  
 nhh wdi din hhh hdi ndi nh、  
 nhh hhh wdi dhhh hhh hhh wnまたは  
 nhh wdi did hhh hdi ddi dh

（式中、nはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンー、デオキシシトシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたはモノチオホス

フェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

hはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシシトシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

iは、デオキシイノシンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェート、

wはいずれも、デオキシアデノシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート、

dはいずれも、デオキシアデノシンー、デオキシグアノシンーまたはデオキシチミジンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェートよりなる群から選ばれた2'-デオキシヌクレオシドモノホスフェートまたはモノチオホスフェート)。

#### 【0022】

上記に記載したように、本発明によるI-ODNには特別のモチーフ(CpGやパリンドロームなどの)は必要ない。しかしながら、好ましい態様において式IによるODNが2'-デオキシイノシンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェートに3'側にて隣接した2'-デオキシシトシンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェートを少なくとも1つ含んでそのような5'-CI3'-モチーフを形成するように、CIモチーフを含むODNが好ましい。

#### 【0023】

本発明による好ましいODNは、下記配列の1またはそれ以上を含む：

gacitt、

iacitt、

gaictt、

iaictt

(式中、aはデオキシアデノシンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェート、

gはデオキシグアノシンーモノホスフェートまたはーモノチオホスフェート、

i はデオキシイノシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート、  
c はデオキシシトシンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート、  
t はデオキシチミジンーモノホスフェートまたは一モノチオホスフェート)。

#### 【0024】

本発明によるI-ODNは、医薬の分野への応用、たとえば動物またはヒトに医薬として投与するのに特に適している。本発明によるI-ODNは、とりわけワクチン組成物中またはワクチン組成物とともに免疫促進剤として機能するのに特に適している。

それゆえ、本発明はまた本発明によるODNを含む医薬組成物にも関する。

#### 【0025】

本発明による好ましい医薬組成物はワクチンであるので、該組成物は本発明によるODNの他に抗原を含んでいなければならない。この抗原がワクチン接種した個体の防御/免疫応答を引き起こす能力は、該抗原を本発明によるODNと組み合わせることにより、とりわけ該ODNの免疫促進作用によって著しく増大する。

#### 【0026】

ワクチンは、全く様々な異なる抗原を含んでいてよい。抗原の例は、不活化したウイルスまたは細菌、真菌、原生生物あるいは癌細胞などの完全に殺した生物である。抗原はまた、これら生物/組織の下部画分(subfractions)、タンパク質、または最も単純な形態でペプチドからなっていることもよい。抗原はまた、グリコシル化タンパク質またはペプチドの形態で免疫系によって認識されてよく、多糖または脂質であるかまたは含んでいてよい。短いペプチドを用いることができる。なぜなら、たとえば細胞障害性T細胞(CTL)は主要組織適合複合体(MHC)と結合した通常8~11アミノ酸長の短い形態の抗原を認識するからである(ラメンシー(Rammensee)ら、Immunogenetics 41, (1995), 178-228)。B細胞は約15アミノ酸から開始して一層長いペプチドを認識する(ハロウ(Harlow)ら、Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, (1988))。

#### 【0027】

T細胞エピトープとは対照的に、B細胞抗原の三次元構造もまた抗体による認



識には重要である。持続した抗原特異的な免疫応答を得るため、必要な免疫系の全ての細胞が関与する免疫カスケードを誘起するのにアジュバントが役に立つ。主としてアジュバントは、その作用の仕方に制限はないが、いわゆる抗原提示細胞（APC）に作用する。これら細胞は通常、まず抗原と出会い、ついでプロセッシングした抗原または非修飾抗原を免疫エフェクター細胞に提示する。媒介する細胞型もまた関与していてよい。適当な特異性を有するエフェクター細胞だけが増殖性の（productive）免疫系において活性化される。アジュバントはまた、抗原および同時に注射した他の因子を局所的に保持する。さらに、アジュバントは他の免疫細胞に対する化学誘引物質として作用し、あるいは免疫系に対する刺激剤として局所的小および/または全身的に作用する。

#### 【0028】

本発明の好ましい態様によれば、T細胞エピトープを抗原として用いる。あるいは、T細胞エピトープとB細胞エピトープとの組み合わせも好ましい。

本発明の組成物に使用する抗原は重要ではない。もちろん、異なる抗原の混合物を本発明に従って用いることも可能である。好ましくは、ウイルスまたは細菌病原体に由来する、または真菌または寄生虫に由来するタンパク質またはペプチドをそのような抗原（誘導体化した抗原またはグリコシル化したまたは脂質化した（lipidated）抗原または多糖または脂質を含む）として用いる。他の好ましい抗原の採取源は腫瘍抗原である。好ましい病原体は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、A型およびB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、クラミジア・ニューモニア（*Chlamydia pneumonias*）、クラミジア・トラコマチス（*Chlamydia trachomatis*）、ミコバクテリウム・チューバーキュローシス（*Mycobacterium tuberculosis*）、ストレプトコッカス・ニューモニア（*Streptococcus pneumonias*）、バシラス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）、ビブリオ・コレラ（*Vibrio cholerae*）、プラスモジウム（*Plasmodium*）種（*Pl. falciparum*, *Pl. vivax*など）、アスペルギルス（*Aspergillus*）種またはカンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）から選択される。

## 【0029】

抗原はまた癌細胞によって発現される分子であってもよい（腫瘍抗原）。入手（derivation）プロセスは、病原体／癌細胞からの特定のタンパク質の精製、該病原体の不活化並びにそのようなタンパク質のタンパク質分解によるまたは化学的な誘導体化または安定化を含む。同様にして、腫瘍抗原（癌ワクチン）または自己免疫抗原もまた本発明による医薬組成物に用いることができる。そのような組成物を用いて腫瘍ワクチン接種または自己免疫疾患の治療を行ってよい。

## 【0030】

ペプチド抗原の場合、ペプチドのミミトープ（mimitopes）／アゴニスト／スーパーアゴニスト（superagonists）／アンタゴニストまたは免疫学的特性に影響を及ぼすことなくある位置で変化させたペプチドまたは非ペプチドのミミトープ／アゴニスト／スーパーアゴニスト／アンタゴニスト（スパービエ（Sparbier）およびウォルデン（Walden）、1999に概説）が本発明に含まれる。ペプチド抗原はまた、ポリカチオン性化合物または免疫促進性化合物との相互作用を容易にするためにペプチド抗原のカルボキシ末端側かまたはアミノ末端側のいずれかに伸長を含んでいてよい。自己免疫疾患の治療のためにはペプチドアンタゴニストを適用することができる。

## 【0031】

抗原はまた、抗原提示および抗原提示細胞への抗原のターゲティングを促進する分子を含むように誘導体化してもよい。

本発明の一つの態様において、本発明の医薬組成物は自己免疫疾患に関与するタンパク質またはタンパク質断片およびペプチドに対する耐性を付与するように働く。この態様に用いる抗原は、免疫系に対して寛容にするかまたは自己免疫プロセスに関与するエピトープに対する免疫応答をダウンレギュレーションするように働く。

好ましくは本発明による医薬組成物、とりわけワクチンの形態の医薬組成物は、ポリカチオン性ポリマー、好ましくはポリカチオン性ペプチド、とりわけポリアルギニン、ポリリシンまたは抗菌性ペプチドをさらに含む。

## 【0032】

本発明に従って用いるポリカチオン性化合物は、WO97/30721による特徴的な作用を示すあらゆるポリカチオン性化合物であってよい。好ましいポリカチオン性化合物は、塩基性ポリペプチド、有機ポリカチオン、塩基性ポリアミノ酸またはその混合物から選ばれる。これらポリアミノ酸は、少なくとも4アミノ酸残基の鎖長を有していなければならない（ゴールドマン（Goldman）ら（1983）に記載のTuftsinを参照）。特に好ましいのは、ポリリシン、ポリアルギニン、および8を超える、とりわけ20を超えるアミノ酸残基の範囲に20%を超える、とりわけ50%を超える塩基性アミノ酸を含むポリペプチドまたはその混合物のようなペプチド結合を含む物質である。他の好ましいポリカチオンおよびその医薬組成物は、WO97/30721（たとえば、ポリエチレンジイミン）およびWO99/38528に記載されている。好ましくは、これらポリペプチドは20～500アミノ酸残基、とりわけ30～200残基を含む。

これらポリカチオン性化合物は化学的にまたは組換えにより製造してよく、あるいは天然の採取源に由来してもよい。

#### 【0033】

カチオン性（ポリ）ペプチドはまた、ガンツ（Ganz）およびレーラー（Lehrer）、1999；ハンコック（Hancock）、1999に概説されている特性を有するポリカチオン性で抗菌性の微生物ペプチドであってもよい。これら（ポリ）ペプチドは、原核生物または動物または植物起源のものであってよく、化学的にまたは組換えにより製造されてよい（アンドロー（Andreu）およびリバ（Rivas）、1998；ガンツ（Ganz）およびレーラー（Lehrer）、1999；シマコ（Simmaco）ら、1998）。そのようなペプチドの配列は、たとえば以下のインターネットアドレスの下に抗菌配列データベース（Antimicrobial Sequences Database）中に見出すことができる：

<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pagl.html>。

#### 【0034】

そのような宿主防御ペプチドまたは防御剤（defensives）もまた、本発明によるポリカチオン性ポリマーの好ましい形態である。一般に、好ましくはAPC（樹状細胞を含む）によって媒介される獲得免疫系を最終生成物として活性化（ま

たはダウンレギュレーション) することを可能にする化合物はポリカチオン性ポリマーとして用いる。

本発明においてポリカチオン性物質として使用するのに特に好ましいのは、カテリシジン (cathelicidin) 由来の抗菌ペプチドまたはその誘導体 (A1416/2000、参照のため本明細書中に引用する)、とりわけ哺乳動物、好ましくはヒト、ウシまたはマウスのカテリシジンに由来する抗菌ペプチド、または(ヒト) 成長ホルモンなどの神経刺激性の化合物である。

### 【0035】

天然の採取源に由来するポリカチオン性化合物としては、HIV-REVまたはHIV-TAT (由来のカチオン性ペプチド、アンテナペディア (antennapedia) ペプチド、キトサンまたはキトサンの他の誘導体) または生化学的な製造または組換え製造によりこれらペプチドまたはタンパク質に由来する他のペプチドが挙げられる。他の好ましいポリカチオン性化合物は、カテリン (cathelin) またはカテリンの関連物質またはカテリンに由来する物質である。たとえば、マウスカテリンは、アミノ酸配列:  $\text{NH}_2\text{-RLAGLLRKGGEKIGEKLLKKIGOKIKNFFQKLVPQPE-COOH}$  を有するペプチドである。カテリンの関連物質またはカテリンに由来する物質はカテリン配列の全部または一部を含み、少なくとも15~20アミノ酸残基を有する。誘導体化は、20の標準アミノ酸以外のアミノ酸による天然アミノ酸の置換または修飾を含む。さらに、さらなるカチオン性残基がそのようなカテリン分子中に導入されてよい。これらカテリン分子は、抗原および本発明による免疫原性ODNと組み合わせるのが好ましい。しかしながら、これらカテリン分子は驚くべきことに、さらなるアジュバントを加えなくとも抗原に対するアジュバントとして有効なことがわかった。それゆえ、そのようなカテリン分子は、さらなる免疫刺激性物質を用いたまたは用いないワクチン製剤において有効なアジュバントとして用いることが可能である。

### 【0036】

本発明に従って用いることのできる他の好ましいポリカチオン性物質は、3~7の疎水性アミノ酸のリンカーによって隔てられた少なくとも2つのKLKモチ

ーフを含む合成ペプチドである（A1789/2000、参照のため本明細書中に引用する）。

本発明による医薬組成物の免疫促進作用が、各成分単独の作用の付加から予測されるものと比較して、あるいは抗原とともに用いたODNまたはポリカチオンの作用の付加から予測されるものと比較してさえも有意に高いことは非常に驚くべきことであった。

#### 【0037】

式I中のBおよびEは、核酸分子の5'末端および／または3'末端の一般的な基である。そのような基の例は、当業者であれば容易に利用できる（たとえば、“Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach”（1991）、エックスタイン（Eckstein）編、オックスフォードユニバーシティプレス）。本発明によるI-ODNについては、Bおよび／またはEは、-H、-CH<sub>3</sub>、-COCH<sub>3</sub>、-OH、-CHO、ホスフェート、チオホスフェート、サルフェートまたはチオサルフェート、またはホスホアルキル基、とりわけC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>のアルキル長および／または末端アミノ基を有するもの（アミノ基は本発明によるI-ODNのさらなる標識に用いることができる、たとえば-PO<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>または-PO<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-標識など）から独立に選ばれるのが好ましい。

#### 【0038】

Bとして特に好ましいのは、ヌクレオシド、とりわけ上記2'デオキシヌクレオチド（すなわち、ホスフェートまたはチオホスフェート基を含まない）である。あるいは、これら基はまた、他の分子、とりわけ担体分子または標識へのリンカー基を含んでいてよい。ODNが固相表面または粒子または標識に結合しているODNのそのような形態では、これら表面、粒子、標識などもBおよび／またはE基の一部である。

もちろん、式Iによる分子のイオン化した（塩）形態や互変異性の形態は式Iに包含される。

#### 【0039】

本発明による医薬組成物は、さらなる活性成分（薬理学的に活性な物質）、と

りわけワクチンに関連して用いることのできる物質をさらに含んでいてよい。そのようなさらなる活性成分の好ましい態様は、サイトカイン、抗炎症性物質、抗菌性物質またはそれらの組み合わせである。

もちろん、本発明による医薬組成物は、補助物質、とりわけ薬理学的に許容しうる担体、緩衝液物質、安定化剤またはそれらの組み合わせをさらに含んでいてよい。

#### 【0040】

本発明の医薬組成物中の成分の相対量は、個々の抗原の必要性および該医薬組成物を投与する動物および／またはヒトに大きく依存する。それゆえ、本発明による医薬組成物は、本発明の1またはそれ以上のODNを好ましくは1 pg～10 g、好ましくは1 ng～1 g、さらに好ましくは100 ng～10 mg、とりわけ10 mg～1 mg含むのが好ましい。抗原およびポリカチオン性ポリマーは同等の投与量で投与してよく、ワクチン当たり1～10,000 mgの抗原および0.1～1,000 mgのポリカチオン性ポリマーが好ましい。

#### 【0041】

本発明の医薬組成物は、患者、たとえばワクチン接種候補者に有効量にて、たとえば1週間、2週間または1ヶ月の間隔で投与してよい。本発明の医薬組成物で処置する患者はまた、繰り返しワクチン接種してもよいし、または1回だけワクチン接種してもよい。本発明の好ましい使用は、とりわけヒトまたは動物を特定の抗原に対して防御することなく能動免疫することである。

本発明の医薬組成物の投与経路は重要ではなく、たとえば、皮下、筋肉内、皮内または経皮注射が経口摂取とともに適している。

#### 【0042】

たとえば抗原／ポリカチオン組成物と別に免疫促進性物質を注射することによって、本発明の医薬組成物を別々に投与することも可能である。それゆえ、本発明はまた、第一の成分として抗原およびポリカチオン性ポリマーを含む組成物、第二の成分として免疫促進性または走化性の物質を含む組成物、を含むキットにも関する。

上記成分は同じ部位に同時に投与することもできるが、異なる部位に異なる時

間で、または異なる期間で投与することも可能である。また、組成物または成分の全身性または局所性の投与をそれぞれ変えることも可能である。

### 【0043】

本発明の詳細を下記実施例および図面により記載するが、本発明はもちろんこれらに限られるわけではない。

#### 実施例

すべての実験においてチオホスフェート置換ODN（ホスフェートをチオホスフェート残基で置換、以下、「チオホスフェート置換オリゴデオキシヌクレオチド」という）を用いたが、これはそのようなODNがより高いヌクレアーゼ耐性を示すからである（バラス（Ballas）ら、1996；クリーグ（Krieg）ら、1995；パロンチ（Parronchi）ら、1999）。

### 【0044】

実施例1：種々のI-ODNとポリL-アルギニン（pR60）とを組み合わせた注射は卵アルブミン由来のペプチドに対する免疫応答を相乗的に促進する

#### マウス：

C57BL/6（Harlan/Olac）

#### ペプチド：

ニワトリ卵アルブミンのMHCクラスI（H-2Kb）拘束エピトープであるOVA<sub>257-264</sub>ペプチド（SIINFEEKL）（ロツツシュク（Rotzschke）ら、1991）を標準固相Fmoc化学合成法を用いて合成し、HPLC精製し、ついで純度をマスマスペクトロメトリーにより分析した。投与量：300mg/マウス。

### 【0045】

#### ポリL-アルギニン60（pR60）：

平均重合度が60アルギニン残基のポリL-アルギニン；SIGMA chemicals。  
投与量：100mg/マウス。

#### CpG-ODN1668：

CpGモチーフを含むチオホスフェート置換ODN：tccatgacgttcctgatgctをNAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成した。投与量

: 5ナノモル/マウス。

【0046】

I-ODN1:

デオキシイノシンを含有するチオホスフェート置換ODN: t c c a t i a  
c i t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッチンゲンにより合成した。

投与量: 5ナノモル/マウス。

I-ODN2:

デオキシイノシンを含有するチオホスフェート置換ODN: t c c a t g a  
c i t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッチンゲンにより合成した。

投与量: 5ナノモル/マウス。

I-ODN3:

デオキシイノシンを含有するチオホスフェート置換ODN: t c c a t i a  
c i t t c c t i a t i c tをNAPS GmbH、ゲッチンゲンにより合成した。

投与量: 5ナノモル/マウス。

【0047】

実験群 (1群5匹のマウス)

1. OVA<sub>257-264</sub>
2. OVA<sub>257-264</sub> + pR60
3. OVA<sub>257-264</sub> + CpG1668
4. OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN1
5. OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN2
6. OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN3
7. OVA<sub>257-264</sub> + CpG1668 + pR60
8. OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN1 + pR60
9. OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN2 + pR60
10. OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN3 + pR60

【0048】

第0日目にマウスの後ろ足に上記化合物を含む全量100ml (各足当たり50ml) を注射した。注射4日後に動物を屠殺し、膝窩リンパ節を回収した。リ



ンパ節を70mmセルストレーナーに通し、5%ウシ胎仔血清(FCS、SIGMA chemicals)を含むDMEM培地(GIBCO BRL)で2回洗浄した。細胞をDMEM/5%FCS中に $3 \times 10^6$ 細胞/mlに調節した。IFN-g ELISPOTアッセイを記載に従って(ミヤヒラ(Miyahira)ら、1995)3回ずつ行った。この方法は、抗原特異的なT細胞の定量をするために広く用いられている手順である。リンパ球をイクスビボにて培地バックグラウンドコントロール、OVA<sub>257-264</sub>ペプチドまたはコンカナバリンA(ConA)で刺激した。単一のIFN-g産生T細胞を表すスポットをカウントし、バックグラウンドスポットの数を全試料から差し引いた。ConAで刺激した後に検出された多数のスポット(データは示していない)は、使用したリンパ球が良好な状態にあることを示している。マウスの各実験群について図1にスポット数/ $1 \times 10^6$ 細胞を示す。

注射1時間後に尾静脈より採血し、血清を調製して全身的なTNF-aの誘発をELISAを用いて決定した(図2)。

#### 【0049】

実施例2：グアノシンをデオキシイノシンで交換すると、とりわけポリレーアルギニン(pR60)と組み合わせたときに非免疫原性のGpC配列が高度に免疫原性の配列に変換される

マウス：

C57B1/6 (Harlan/Olac)

ペプチド：

ニワトリ卵アルブミンのMHCクラスI(H-2Kb)拘束エピトープであるOVA<sub>257-264</sub>ペプチド(SIINFEEKL)(ロッツシュク(Rotzschke)ら、1991)を標準固相Fmoc合成法を用いて合成し、HPLC精製し、ついで純度をマスマスペクトロメトリーにより分析した。投与量： $300 \mu\text{g}$ /マウス。

#### 【0050】

ポリレーアルギニン60(pR60)：

平均重合度が60アルギニン残基のポリレーアルギニン；SIGMA chemicals。

投与量：100  $\mu$ g/マウス。

CpG-ODN1668：

CpGモチーフを含むチオホスフェート置換ODN：tcc atg acg  
t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成した。投与量  
：5ナノモル/マウス。

GpC-ODN：

非免疫原性のGpCモチーフを含むチオホスフェート置換ODN：tcc a  
t g a g c t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成  
した。投与量：5ナノモル/マウス。

【0051】

I-ODN9：

デオキシイノシンを含有するチオホスフェート置換ODN：tcc atg a  
i c t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成した。  
投与量：5ナノモル/マウス。

I-ODN10：

デオキシイノシンを含有するチオホスフェート置換ODN：tcc a t i a  
i c t t c c t i a t i c tをNAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成した。  
投与量：5ナノモル/マウス。

【0052】

実験群（1群5匹のマウス）

OVA<sub>257-264</sub>

OVA<sub>257-264</sub> + pR60

OVA<sub>257-264</sub> + CpG1668

OVA<sub>257-264</sub> + GpC

OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN9

OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN10

OVA<sub>257-264</sub> + CpG1668 + pR60

OVA<sub>257-264</sub> + GpC + pR60

OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN9 + pR60

OVA<sub>257-264</sub> + I-ODN10 + pR60

【0053】

第0日目にマウスの各後ろ足に上記化合物を含む全量100 $\mu$ l（各足当たり50 $\mu$ l）を注射した。注射4日後に動物を屠殺し、膝窩リンパ節を回収した。リンパ節を70 $\mu$ mセルストレーナーに通し、5%ウシ胎仔血清（FCS、SIGMA chemicals）を含むDMEM培地（GIBCO BRL）で2回洗浄した。細胞をDMEM/5%FCS中に $3 \times 10^6$ 細胞/mlに調節した。IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイを記載に従って（ミヤヒラ（Miyahira）ら、1995）3回ずつ行った。この方法は、抗原特異的なT細胞の定量をするために広く用いられている手順である。リンパ球をイクスピボにて培地（バックグラウンド）、OVA<sub>257-264</sub>ペプチド、無関係のペプチドmTRP<sub>2181-188</sub>（マウスチロシナーゼ関連プロテイン2、VYDFFVWL）、pR60およびコンカナバリンA（ConA）で刺激した。単一のIFN- $\gamma$ 産生T細胞を表すスポットをカウントし、バックグラウンドスポットの数を全試料から差し引いた。ConAで刺激した後に検出された多数のスポット（データは示していない）は、使用したリンパ球が良好な状態にあることを示している。マウスの各実験群について図3にスポット数/ $1 \times 10^6$ 細胞を示してあり、イクスピボで刺激した3回の試行の標準偏差を示してある。注射1時間後に尾静脈より採血し、血清を調製して全身的なTNF- $\alpha$ およびIL-6の誘発をサイトカイン特異的ELISAを用いて決定した（図4）。

【0054】

実施例3：デオキシイノシンを含むランダムな20-mer配列とメラノーマ由来のペプチドとを組み合わせた注射は該ペプチドに対する強い免疫応答を誘発し、該免疫応答はポリL-アルギニン（pR60）を同時に投与することによってさらに促進することができる

マウス：

C57B1/6（Harlan/Olac）

ペプチド：

マウスチロシナーゼ関連プロテイン2のMHCクラスI（H-2K<sup>b</sup>）拘束エ

ピトープであるTRP-2ペプチド(VYDFVWL) (ブロム(Biom)ら、1997)を標準固相Fmoc合成法により合成し、HPLC精製し、ついで純度をマスマススペクトロメトリーにより分析した。投与量: 300  $\mu$ g/マウス。

# 【0055】

ポリL-アルギニン60 (pR60) :

平均重合度が60アルギニン残基のポリL-アルギニン; SIGMA chemicals。

投与量: 100  $\mu$ g/マウス。

CpG-ODN1668 :

CpGモチーフを含むチオホスフェート置換ODN: t c c a t g a c g  
t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッチングンにより合成した。投与量: 5ナノモル/マウス。

# 【0056】

w d i :

チオホスフェート置換ODN: n h h h h h w d i n h h h h h h  
w nをNAPS GmbH、ゲッチングンにより合成した。投与量: 5ナノモル/マウス。

w d i d i n :

チオホスフェート置換ODN: n h h h h h w d i n h h h h h h  
w nをNAPS GmbH、ゲッチングンにより合成した。投与量: 5ナノモル/マウス。

w d i d :

チオホスフェート置換ODN: n h h h h h w d i d h h h h h h  
w nをNAPS GmbH、ゲッチングンにより合成した。投与量: 5ナノモル/マウス。

w d i d i d :

チオホスフェート置換ODN: n h h w d i d i d h h h h d i d d i  
d hをNAPS GmbH、ゲッチングンにより合成した。投与量: 5ナノモル/マウス。

## 【0057】

実験群（1群5匹のマウス）

1. TRP-2
2. TRP-2 + pR60
3. TRP-2 + CpG1668
4. TRP-2 + wdi
5. TRP-2 + wdidin
6. TRP-2 + wdid
7. TRP-2 + wdidid
8. TRP-2 + CpG1668 + pR60
9. TRP-2 + wdi + pR60
10. TRP-2 + wdidin + pR60
11. TRP-2 + wdid + pR60
12. TRP-2 + wdidid + pR60

## 【0058】

第0日目にマウスの各後ろ足に上記化合物を含む全量 $100\mu\text{l}$ （各足当たり $50\mu\text{l}$ ）を注射した。注射4日後に動物を屠殺し、膝窩リンパ節を回収した。リンパ節を $70\mu\text{m}$ セルストレーナーに通し、5%ウシ胎仔血清（FCS、SIGMA chemicals）を含むDMEM培地（GIBCO BRL）で2回洗浄した。細胞をDMEM/5%FCS中に $3\times 10^6$ 細胞/mlに調節した。IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイを記載に従って（ミヤヒラ（Miyahira）ら、1995）3回ずつ行った。この方法は、抗原特異的なT細胞の定量をするために広く用いられている手順である。リンパ球をイクスビボにて培地（バックグラウンド）、TRP-2ペプチド、無関係のOVA<sub>257-264</sub>ペプチド、pR60およびコンカナバリンA（ConA）で刺激した。単一のIFN- $\gamma$ 産生T細胞を表すスポットをカウントし、バックグラウンドスポットの数を全試料から差し引いた。ConAで刺激した後に検出された多数のスポット（データは示していない）は、使用したリンパ球が良好な状態にあることを示している。マウスの各実験群について図5にスポット数/ $1\times 10^6$ 細胞を示してあり、イクスビボで刺激した3回の試行の標準

偏差を示してある。

【0059】

実施例4：I-ODNとポリL-アルギニン（pR60）とを組み合わせた注射はメラノーマ由来のペプチドに対する免疫応答を相乗的に促進する

実験群（1群5匹のマウス）

1. TRP-2181-188
2. TRP-2181-188 + pR60
3. TRP-2181-188 + CpG1668
4. TRP-2181-188 + I-ODN2
5. TRP-2181-188 + CpG1668 + pR60
6. TRP-2181-188 + I-ODN2 + pR60

【0060】

第0日目にマウスの各後ろ足に上記化合物を含む全量100 $\mu$ l（各足当たり50 $\mu$ l）を注射した。注射4日後に動物を屠殺し、膝窩リンパ節を回収した。リンパ節を70 $\mu$ mセルストレーナーに通し、5%ウシ胎仔血清（FCS、SIGMA chemicals）を含むDMEM培地（GIBCO BRL）で2回洗浄した。細胞をDMEM/5%/FCS中に $3 \times 10^6$ 細胞/mlに調節した。IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイを記載に従って（ミヤヒラ（Miyahira）ら、1995）3回ずつ行った。この方法は、抗原特異的なT細胞の定量をするために広く用いられている手順である。リンパ球をイクスビボにて培地バックグラウンドコントロール、TRP-2181-188ペプチド、無関係のOVA<sub>257-264</sub>ペプチドおよびコンカナバリンA（ConA）で刺激した。単一のIFN- $\gamma$ 産生T細胞を表すスポットをカウントし、バックグラウンドスポットの数を全試料から差し引いた。ConAで刺激した後に検出された多数のスポット（データは示していない）は、使用したリンパ球が良好な状態にあることを示している。マウスの各実験群について図6にスポット数/ $1 \times 10^6$ 細胞を示してあり、イクスビボで刺激した3回の試行の標準偏差を示してある。

注射1時間後に尾静脈より採血し、血清を調製して全身的なTNF- $\alpha$ およびIL-6の誘発をサイトカイン特異的ELISAを用いて決定した（図7）。

## 【0061】

実施例5：ランダムな10-mer I-ODNとポリレーアルギニン (pR60) とを組み合わせた注射はメラノーマ由来のペプチドに対する免疫応答を相乗的に促進する

実験群 (1群5匹のマウス)

1. TRP-2181-188
2. TRP-2181-188 + pR60
3. TRP-2181-188 + CpG1668
4. TRP-2181-188 + ODN17
5. TRP-2181-188 + CpG1668 + pR60
6. TRP-2181-188 + ODN17 + pR60

## 【0062】

第0日目にマウスの各後ろ足に上記化合物を含む全量100 $\mu$ l (各足当たり50 $\mu$ l) を注射した。注射4日後に動物を屠殺し、膝窩リンパ節を回収した。リンパ節を70 $\mu$ mセルストレーナーに通し、5%ウシ胎仔血清 (FCS, SIGMA chemicals) を含むDMEM培地 (GIBCO BRL) で2回洗浄した。細胞をDMEM/5%/FCS中に $3 \times 10^6$ 細胞/mlに調節した。IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイを記載に従って (ミヤヒラ (Miyahira) ら、1995) 3回ずつ行った。この方法は、抗原特異的なT細胞の定量をするために広く用いられている手順である。リンパ球をイクスビボにて培地バックグラウンド-コントロール、TRP-2181-188 ペプチド、無関係のOVA257-264 ペプチドおよびコンカナバリンA (ConA) で刺激した。単一のIFN- $\gamma$  産生T細胞を表すスポットをカウントし、バックグラウンドスポットの数を全試料から差し引いた。ConAで刺激した後に検出された多数のスポット (データは示していない) は、使用したリンパ球が良好な状態にあることを示している。マウスの各実験群について図8にスポット数/ $1 \times 10^6$ 細胞を示してあり、イクスビボで刺激した3回の試行の標準偏差を示してある。

## 【0063】

マウス：

C57B1/6 (Harlan/Olac)

ペプチド:

マウスチロシナーゼ関連プロテイン2のMHCクラスI (H-2K<sup>b</sup>) 拘束エピトープであるTRP-2ペプチド (VYDFFVWL) (ブロム (Blom) ら、1997) を標準固相Fmoc合成法により合成し、HPLC精製し、ついで純度をマスマススペクトロメトリーにより分析した。投与量: 100 μg/マウス。

【0064】

ポリ-L-アルギニン60 (pR60):

平均重合度が60アルギニン残基のポリ-L-アルギニン; SIGMA chemicals。

投与量: 100 μg/マウス。

CpG-ODN1668:

CpGモチーフを含むチオホスフェート置換ODN: t c c a t g a c g  
t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッチングェンにより合成した。投与量: 5ナノモル/マウス。

ODN17:

デオキシイノシンを含むチオホスフェート置換ODN: h h h w d i d h h  
hをNAPS GmbH、ゲッチングェンにより合成した (h = CAT、w = AT、d = GAT)。投与量: 10ナノモル/マウス。

【0065】

マウス:

C57B1/6 (Harlan/Olac)

ペプチド:

マウスチロシナーゼ関連プロテイン2のMHCクラスI (H-2K<sup>b</sup>) 拘束エピトープであるTRP-2ペプチド (VYDFFVWL) (ブロム (Blom) ら、1997) を標準固相Fmoc合成法により合成し、HPLC精製し、ついで純度をマスマススペクトロメトリーにより分析した。投与量: 100 μg/マウス。

【0066】



ポリL-アルギニン60 (pR60) :

平均重合度が60アルギニン残基のポリL-アルギニン; SIGMA chemicals.

投与量: 100  $\mu$ g/マウス。

CpG-ODN1668 :

CpGモチーフを含むチオホスフェート置換ODN: t c c a t g a c g  
t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッチングンにより合成した。投与量  
: 5ナノモル/マウス。

I-ODN2 :

デオキシイノシンを含むチオホスフェート置換ODN: t c c a t g a c i  
t t c c t g a t g c tをNAPS GmbH、ゲッチングンにより合成した。投与  
量: 5ナノモル/マウス。

## 【0067】

実施例6 : オリゴデオキシIC<sub>26-mer</sub>とポリL-アルギニン (pR) とを組み合  
わせた投与は卵アルブミン (OVA) 特異的な体液性応答を促進する

マウス :

C57B1/6 (Harlan/Olac)

卵アルブミン (OVA) :

ニワトリ卵からの卵アルブミン、グレードV、SIGMA chemicals、A-550  
3、ロット54H7070 : 投与量: 50  $\mu$ g/マウス。

## 【0068】

ポリL-アルギニン (pR) :

平均重合度が60アルギニン残基のポリL-アルギニン; SIGMA chemicals、  
P-4663、ロット68H5903。投与量: 100  $\mu$ g/マウス。

オリゴデオキシIC<sub>26-mer</sub> (オリゴdIC<sub>26-mer</sub>) :

オリゴdIC<sub>26-mer</sub>を標準ホスホアミダイト化学により4  $\mu$ モルスケールで合  
成し、HPLC (NAPS GmbH、ゲッチングン、ドイツ) により精製した。投与量  
: 5ナノモル/マウス。

## 【0069】

実験群 (1群4匹のマウス)

1. OVA + オリゴd I C<sub>26-mer</sub> + p R
2. OVA + オリゴd I C<sub>26-mer</sub>
3. OVA + p R
4. OVA

## 【0070】

第0日目にマウスの各後ろ足に上記化合物を含む全量100 $\mu$ l（各足当たり50 $\mu$ l）を注射した。注射24時間後に血清を回収し、OVA特異的抗体の存在についてELISAによりスクリーニングした。これらの結果は、OVAとオリゴd I Cおよびp Rとを組み合わせた注射がOVAを各物質単独で注射したときに比べてOVA特異的なIg G抗体の産生を促進したことを示している（図13A、B）。興味深いことに、オリゴd I C／p Rと組み合わせたOVAの単一の注射を行ったときにIg G 2 aおよびIg G 1の両者の力価が増大し、Th 1細胞およびTh 2細胞の両者が関与していることを意味していた。しかしながら、115日後にはOVAとオリゴd I C／p Rとを注射したマウスの血清でIg G 2 aの増大レベルのみが検出できた。

これらデータは、オリゴd I Cおよびp Rと組み合わせたOVAの注射がOVA特異的な体液性応答を促進することを示している。この応答は、初期の相ではTh 1およびTh 2の両者により誘発された抗体イソ型が産生されるが、その後、主としてTh 1によって誘発された抗体が産生されるという特徴を有する。

## 【0071】

参考文献

## 【0072】

## 【表1】

Andreu, D., および Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.

Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., および Krieg, A. M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motif in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157, 1840-1845.

Bloom, B. R., および Widdus, R. (1998). Vaccine visions and their global impact. *Nat Med* 4, 480-484.

Bloom, M. B., Perry-Lalley, D., Robbins, P. F., Li, Y., el-Gamil, M., Rosenberg, S. A., および Yang, J. C. (1997). Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B 16 melanoma. *J Exp Med* 185, 453-459.

Buschle, M., Schmidt, W., Berger, M., Schaffner, G., Kurzbauer, R., Killisch, I., Tiedemarm, J.K., Trska, B., Kirlappos, H., Mechtler, K., Schilcher, F., Gabler, C., および Birnstiel, M. L. (1998). Chemically defined, cell-free cancer vaccines: use of tumor antigen-derived peptides or polypeptide proteins for vaccination. *Gene Ther. Mol. Biol.* 1, 309-321

Buschle, M., Schmidt, W., Zauner, W., Mechtler, K., Trska, B., Kirlappos, H., および Birnstiel, M.L. (1997). Transloading of tumor antigen-derived peptides into antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3256-3261

Cavanaugh, P.F., Jr., Ho, Y-K, および Bardos, T.J. (1996). The activation of murine macrophages and natural killer cells by the Partially thiolated double stranded RNA poly (1). mercapto poly(C). *Res.Comm.Mol.Pathol.Pharmacol.* 91, 131-147

Chace, J. H., Hooker, N. A., Mildenstein, K. L., Krieg, A. M., および Cowdery, J. S. (1997). Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL- 12. *Clin Immunol Immunopathol* 84, 185-193.

Davis, H. L., Weeranta, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L.,

【0073】

【表2】

Schorr, J., および Krieg, A. M. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160, 870-876.

Deng, G. M., Nilsson, I. M., Verdrengh, M., Collins, L. V., および Tarkowski, A. (1999). Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 5, 702-705.

Ganz, T. (1999). Defensins and host defense [comment]. *Science* 286, 420-421.

Ganz, T., および Lehrer, R. I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 5, 292-297.

Hancock, R. E. (1999). Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57, 469-473.

Harlow, E., および Lane, D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).

Hartmann, G., Weiner, G. J., および Krieg, A. M. (1999). CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9305-9310.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., および Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.

Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., および Krieg, A. M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2879-2883.

Krieg, A. M. (1999). CpG DNA: a novel immunomodulator [letter]. *Trends Microbiol* 7, 64-5.

Krieg, A. M. (1996). An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med* 128, 128-133.

【0074】

【表3】

Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., および Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.

Krieg, A. M., Yi, A. K., Schorr, J., および Davis, H. L. (1998). The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol* 6, 23-27.

Lethe, B., van den Eynde, B., van Pel, A., Corradin, G., および Boon, T. (1992). Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B: two epitopes carried by a single peptide. *Eur J Immunol* 22, 2283-2288.

Liljeqvist, S., および Stahl, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 73, 1-33.

Lipford, G. B., Heeg, K., および Wagner, H. (1998). Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol* 6, 496-500.

Manetti, R., Annunziato, F., Tomasevic, L., Gianno, V., Parronchi, P., Romagnani, S. および Maggi, E. (1995). Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon- $\alpha$  and interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* 25, 2656-2660

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., および Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.

Nossal, G. (1998). Living up to the legacy. *Nat Med* 4, 475-476

Oxenius, A., Martinic, M. M., Hengartner, H., および Klenerman, P. (1999). CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol* 73, 4120-4126.

[0075]

【表4】

Paillard, F. (1999). CpG: the double-edged sword [comment]. *Hum Gene Ther* 10, 2089-2090.

Pamer, E. G., Harty, J. T., および Bevan, M. J. (1991). Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353, 852-855.

Parronchi, P., Brugnolo, F., Annunziato, F., Manuelli, C., Sampognaro, S., Mavilia, C., Romagnani, S., および Maggi, E. (1999). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4<sup>+</sup> T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 163, 5946-5953.

Pisetsky, D. S. (1997). Immunostimulatory DNA: a clear and present danger? *Nat Med* 3, 829-831.

Pisetsky, D. S. (1999). The influence of base sequence on the immunostimulatory properties of DNA. *Immunol Res* 19, 35-46.

Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanović S. (1995), MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228

Rodrigues, M., Nussenzweig, R. S., Romero, P., および Zavala, F. (1992). The in vivo cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T cell clones correlates with their levels of expression of adhesion molecules. *J Exp Med* 175, 895-905.

Roitt, I., Brostoff, J., および Male, D. (1998). *Immunology* (London: Mosby International Ltd).

Rotzschke, O., Falk, K., Stevanović, S., Jung, G., Walden, P., および Rammensee, H. G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 21, 2891-2894.

Schmidt, W., Buschle, M., Zauner, W., Kirlappos, H., Mechtler, K., Trska, B., および Bimstiel, M.L. (1997). Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3262-3267

Schwartz, D. A., Quinn, T. J., Thorne, P. S., Sayeed, S., Yi, A.

【0076】

【表5】

K., および Krieg, A. M. (1997). CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract, *J Clin Invest* 100, 68-73.

Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J. W., Marrack, P., および Grey, H. M. (1984). Antigen recognition by H2-restricted T cells 11. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J Immunol* 133, 2067-2074.

Simmaco, M., Mignogna, G., および Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47, 435-450.

Sparbier, K., および Walden, P. (1999). T cell receptor specificity and mimotopes. *Curr Opin Immunol* 11, 214-218.

Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W., および Wagner, H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 2045-2054.

Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K., および Wagner, H. (1997). Bacterial DNA causes septic shock [letter]. *Nature* 386, 336-337.

Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., および Wagner, H. (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motif: induction of tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated shock. *Eur J Immunol* 27, 1671-1679.

Weiner, G. J., Liu, H. M., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E., および Krieg, A. M. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10833-10837.

Yew, N. S., Wang, K. X., Przybylska, M., Bagley, R. G., Stedman, M., Marshall, J., Scheule, R. K., および Cheng, S. H. (1999). Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum Gene Ther* 10, 223-234.

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 卵アルブミン由来ペプチドOVA<sub>257-264</sub>、ポリ-L-アルギニン (pR60) およびデオキシイノシンI含有オリゴデオキシヌクレオチド (I-

ODN) またはCpG1668を注射後のOVA<sub>257-264</sub>に対する免疫応答を示す。マウスの後ろ足に所定の混合物を注射した。4日後、水切りしたリンパ節細胞をイクスビボにてOVA<sub>257-264</sub>で刺激した。24時間後にIFN- $\gamma$ 産生細胞の数をELISPOTアッセイを用いて決定した。結果をスポット数/1×10<sup>6</sup>リンパ節細胞として表してある。

【図2】 OVA<sub>257-264</sub>、ポリ-L-アルギニン (pR60) およびI含有オリゴデオキシヌクレオチド (I-ODN) またはCpG1668を注射後の全身性のTNF- $\alpha$ 産生の誘発を示す。マウスの後ろ足に所定の混合物を注射した。注射1時間後に尾静脈から採血し、血清を調製した。血清中のTNF- $\alpha$ の濃度をELISAを用いて決定した。

【図3】 卵アルブミン由来ペプチドOVA<sub>257-264</sub>、ポリ-L-アルギニン (pR60) およびデオキシイノシン含有オリゴデオキシヌクレオチド (I-ODN)、CpG1668またはGpCを注射後のOVA<sub>257-264</sub>に対する免疫応答を示す。マウスの後ろ足に所定の混合物を注射した。4日後、水切りしたリンパ節細胞をイクスビボにてOVA<sub>257-264</sub>、無関係のペプチドmTRP2<sub>181-188</sub> (マウスチロシナーゼ関連プロテイン2、VYDFFVWL) またはpR60で刺激した。24時間後にIFN- $\gamma$ 産生細胞の数をELISPOTアッセイを用いて決定した。結果をスポット数/1×10<sup>6</sup>リンパ節細胞として3回の試行の標準偏差とともに表してある。

【図4】 OVA<sub>257-264</sub>、ポリ-L-アルギニン (pR60) およびI含有オリゴデオキシヌクレオチド (I-ODN)、GpCまたはCpG1668を注射後の全身性のTNF- $\alpha$ 産生の誘発を示す。マウスの後ろ足に所定の混合物を注射した。注射1時間後に尾静脈から採血し、血清を調製した。血清中のTNF- $\alpha$ およびIL-6の濃度をサイトカイン特異的なELISAを用いて決定した。

【図5】 TRP-2、ポリ-L-アルギニン、CpG1668またはデオキシイノシンを含むランダムな20-mer配列を注射後の卵アルブミン由来ペプチドOVA<sub>257-264</sub>に対する免疫応答を示す。マウスの後ろ足に所定の混合物を注射した。4日後、水切りしたリンパ節細胞をイクスビボにてTRP-2、無関



系のペプチドOVA<sub>257-264</sub>またはpR60で刺激した。24時間後にIFN- $\gamma$ 産生細胞の数をELISPOTアッセイを用いて決定した。結果をスポット数/1×10<sup>6</sup>リンパ節細胞として3回の試行の標準偏差とともに表してある。

【図6】 メラノーマ由来ペプチドとI-ODNおよびポリ-L-アルギニン(pR60)とを組み合わせた注射を示す。

【図7】 メラノーマ由来ペプチドとI-ODNおよびpR60とを組み合わせた注射が全身性のTNF- $\alpha$ およびIL-6の誘発を低減させることを示す。

【図8】 メラノーマ由来ペプチドとランダムな10-mer I-ODNおよびpR60とを組み合わせた注射を示す。

【図9】 オリゴdIC<sub>26</sub>-merおよびpRと組み合わせた卵アルブミン(OVA)の投与がOVA特異的なIgG抗体の産生を促進することを示す。マウスの後ろ足に所定の混合物を皮下注射した。注射24日および115日後に血清を回収し、OVA特異的なIgG2a抗体(A)およびIgG1抗体(B)についてELISAによりスクリーニングした。結果を抗体力価として示す。

【図1】

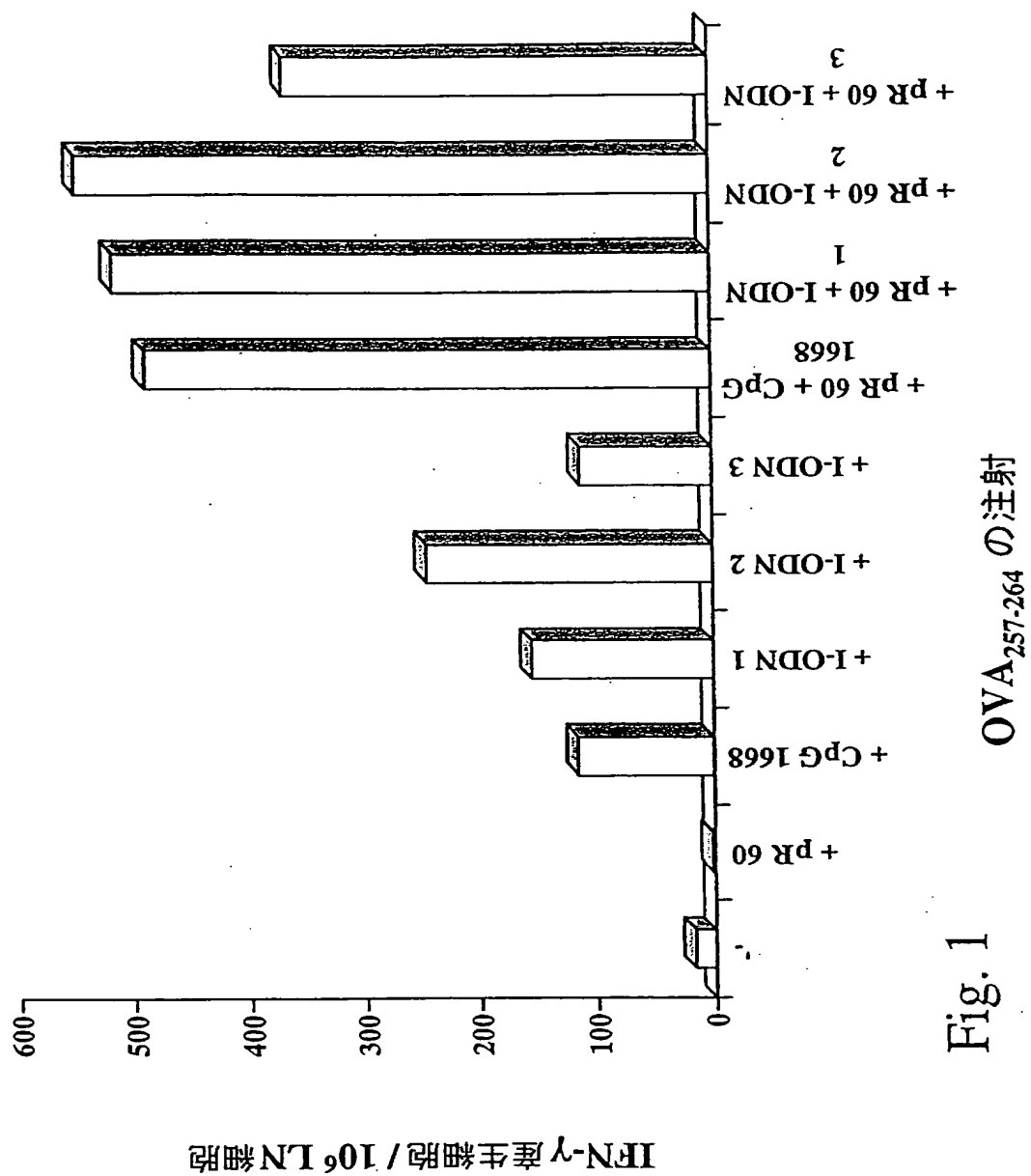


Fig. 1

【図2】

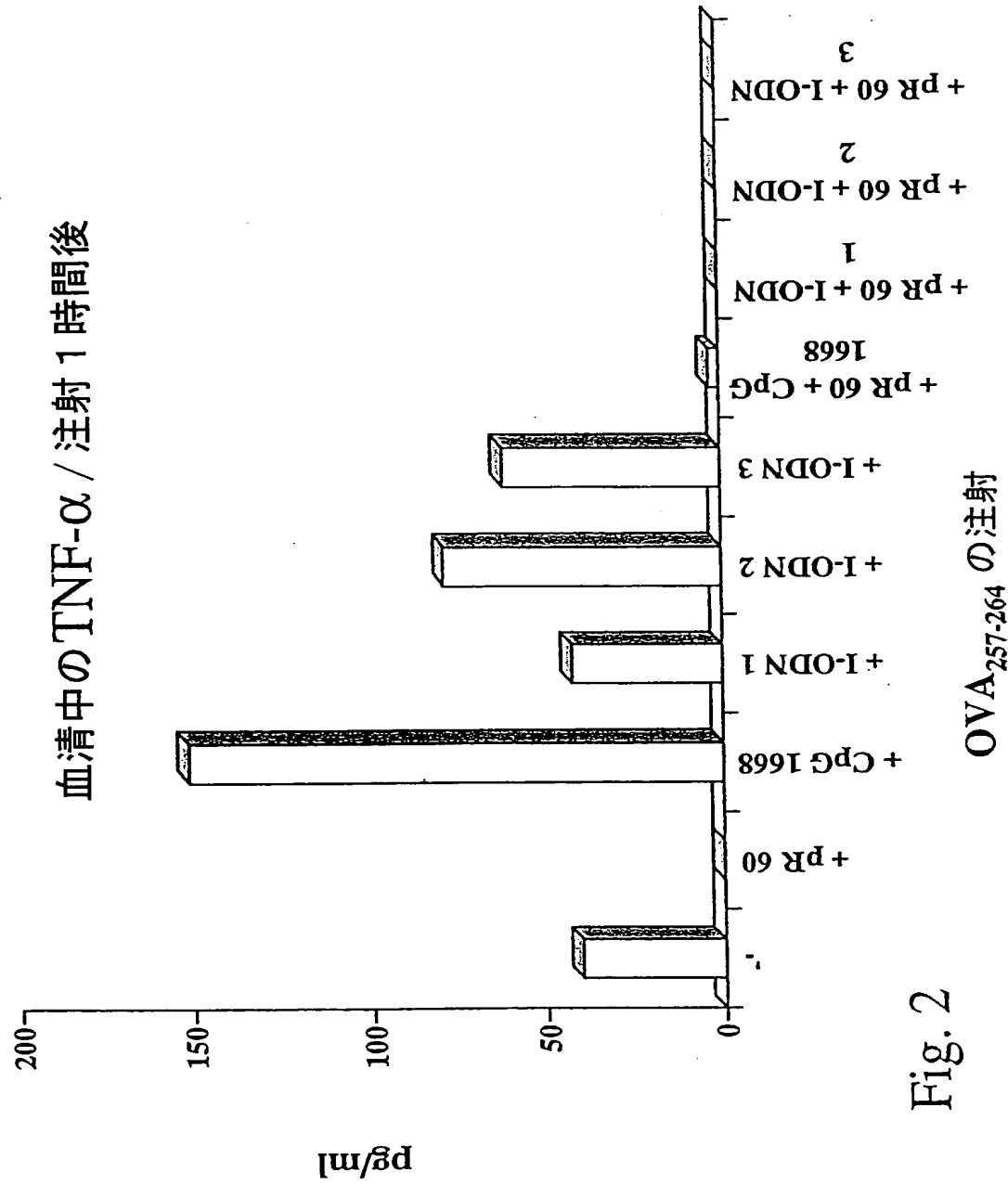
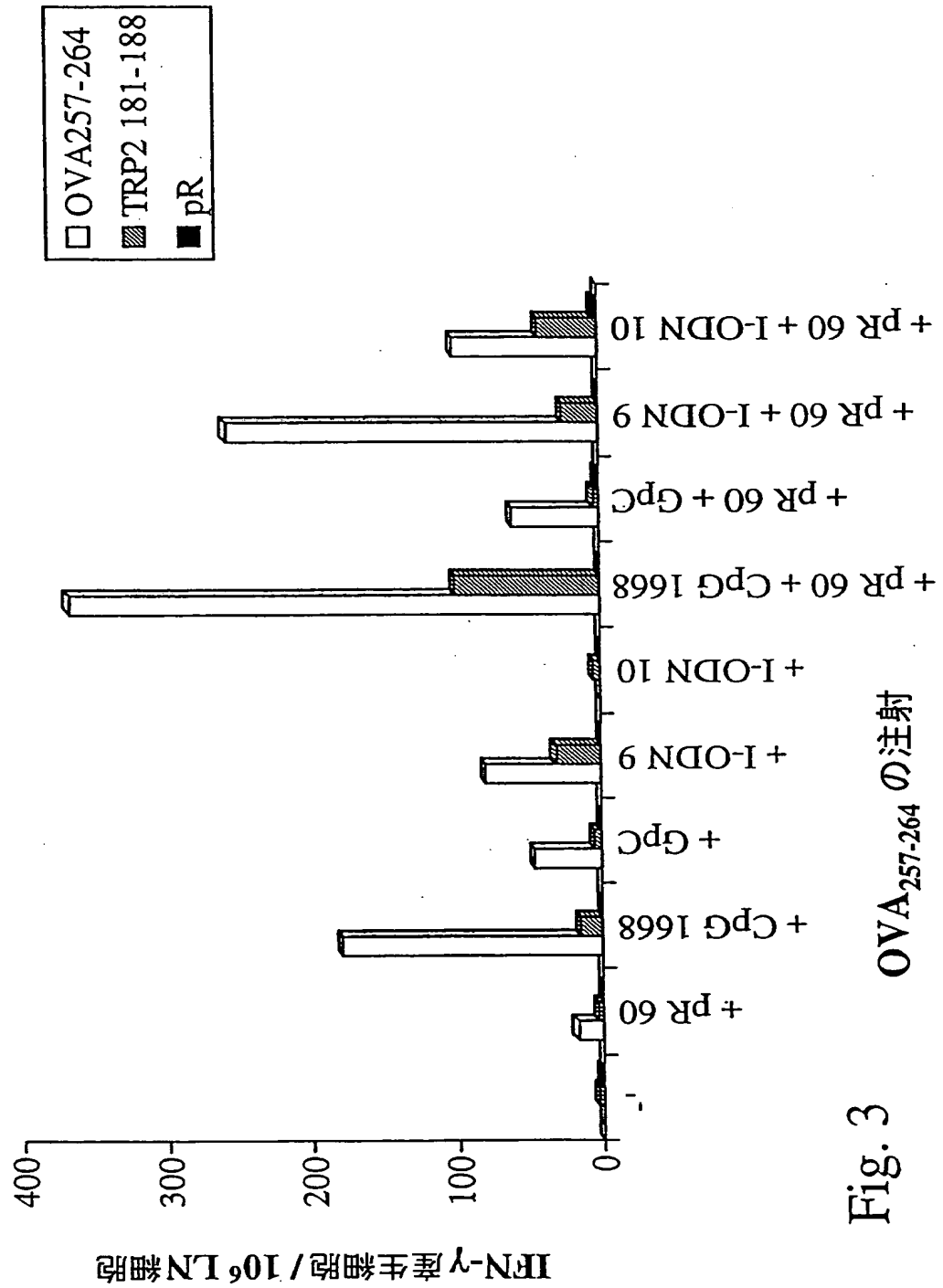


Fig. 2

【図3】

Fig. 3 OVA<sub>257-264</sub> の注射

【図4】

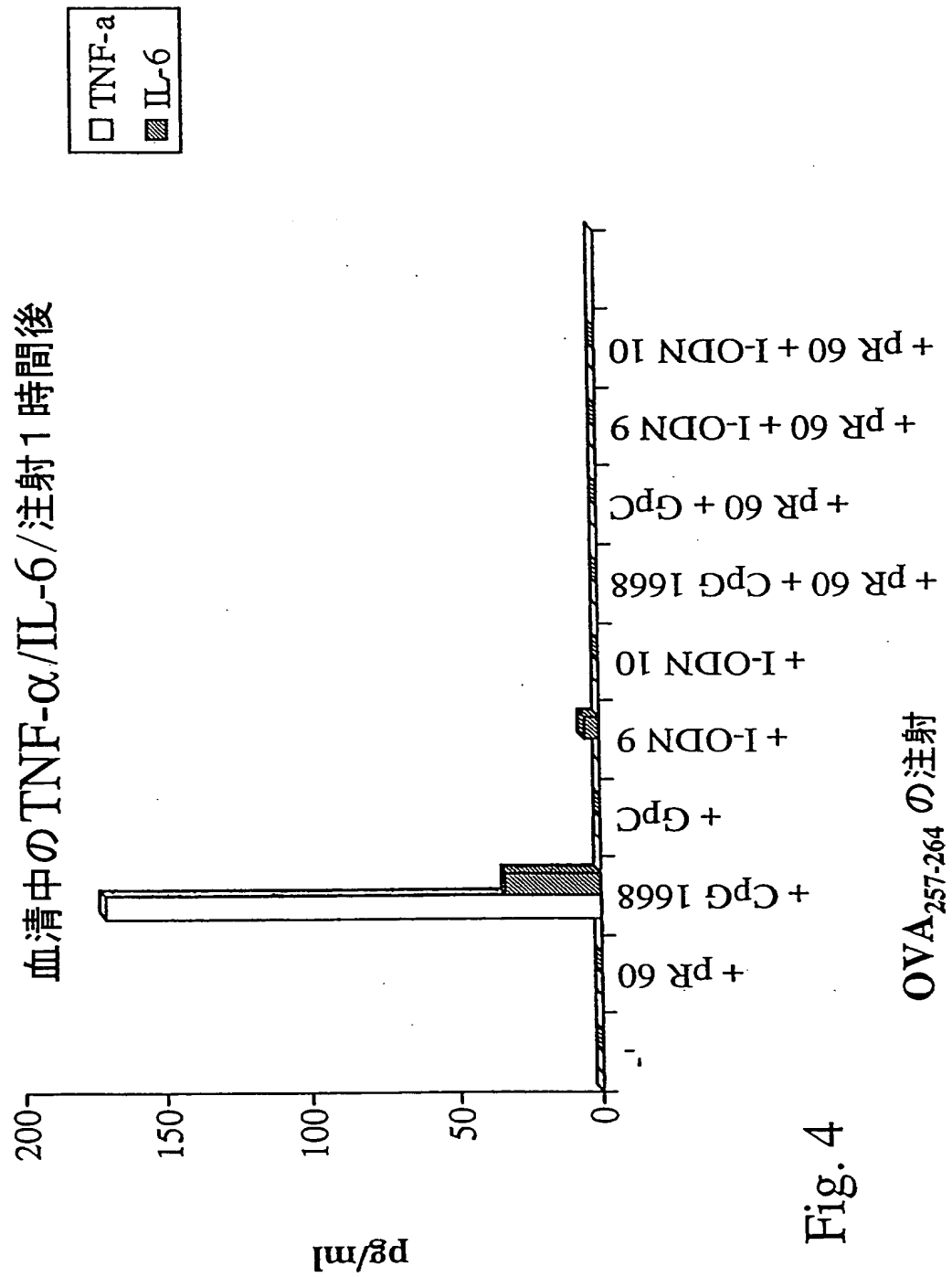
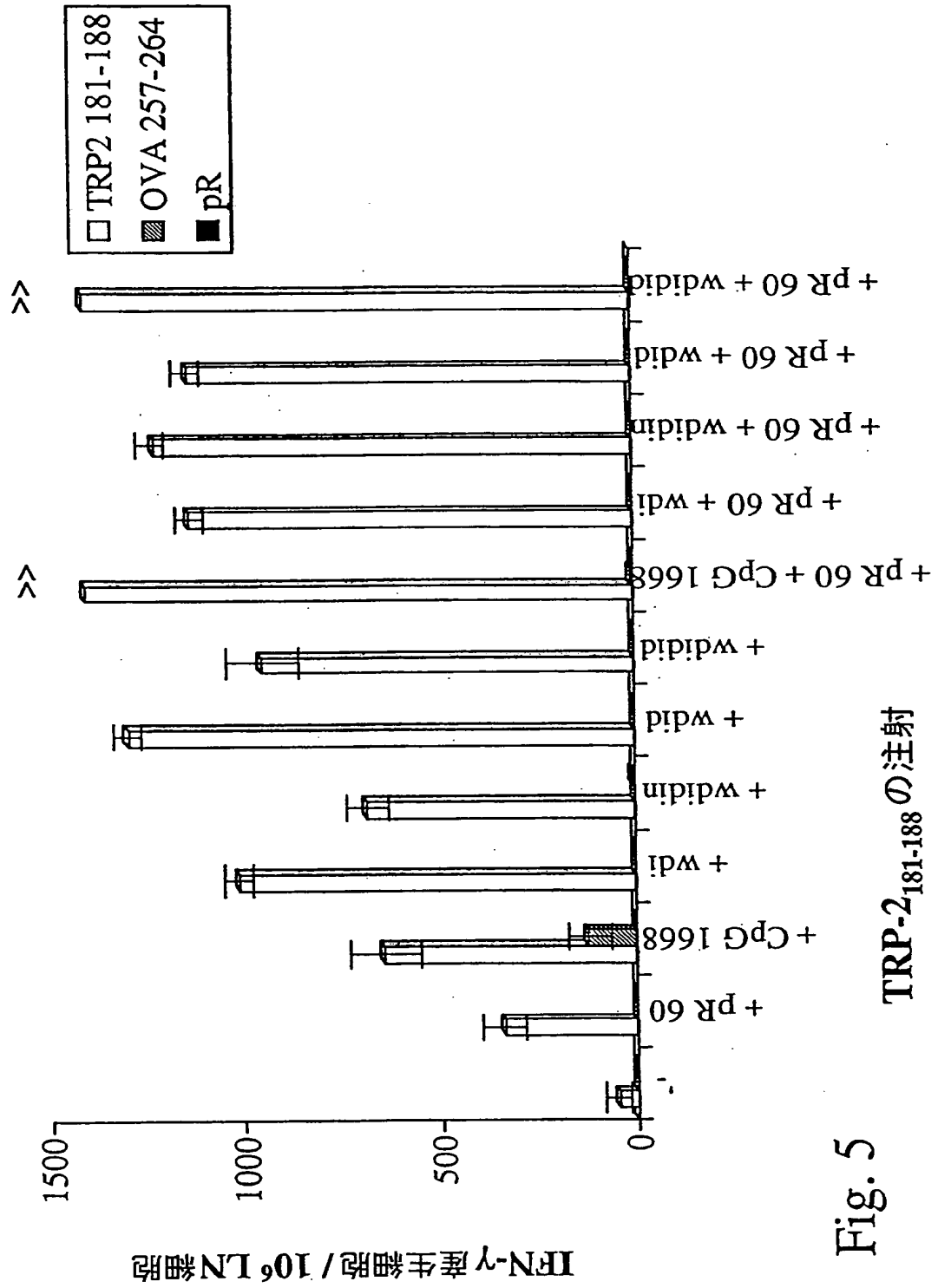


Fig. 4

【図5】



【図6】

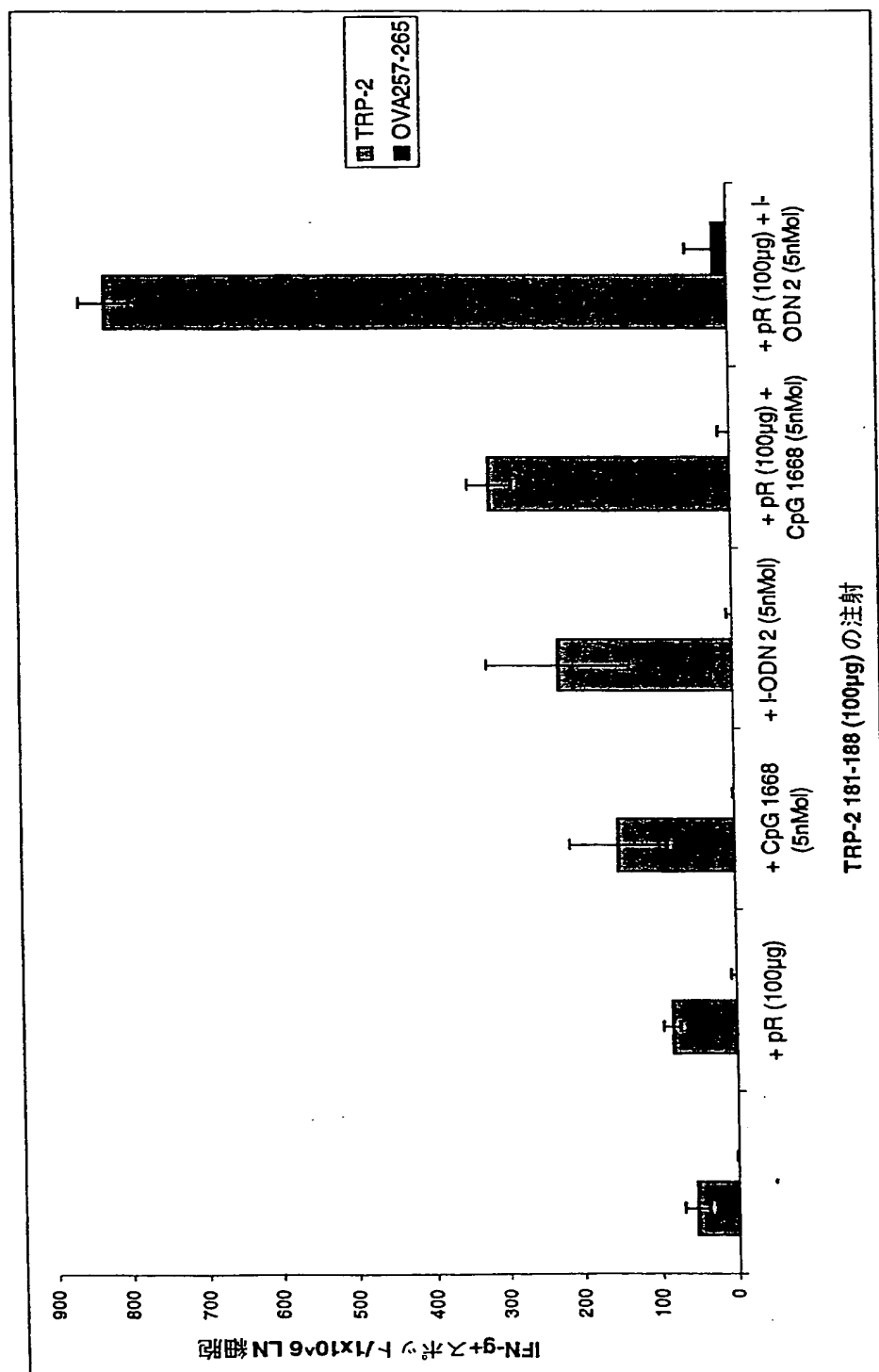


Fig. 6

【図7】

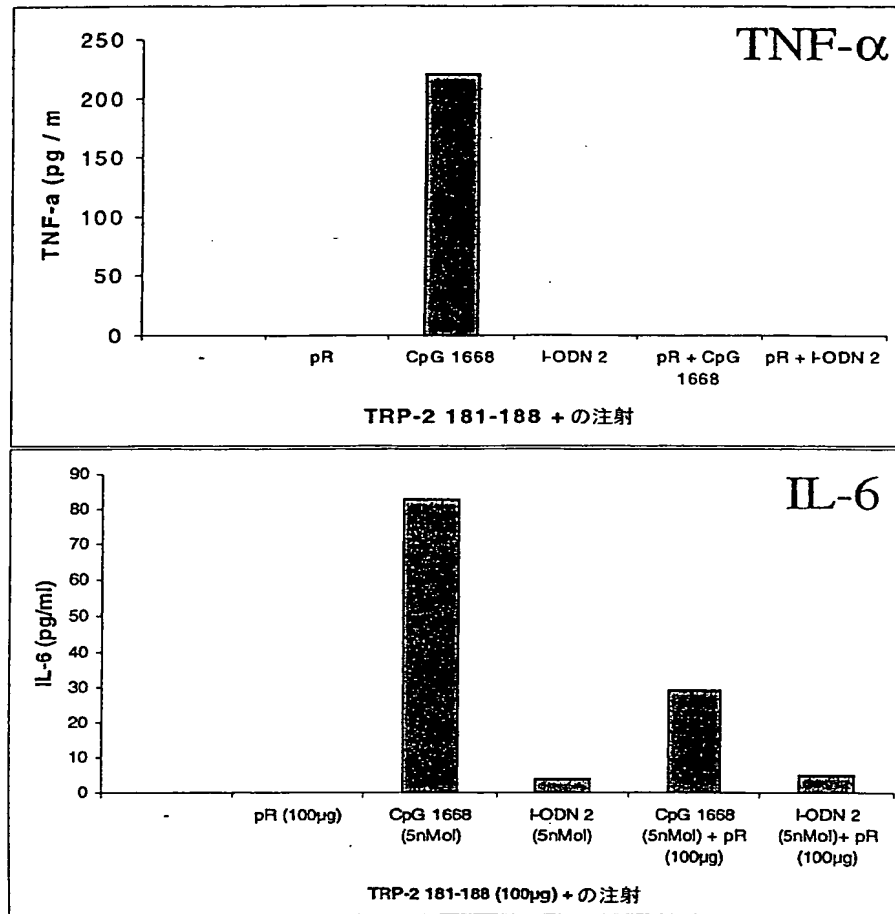


Fig. 7



【図8】

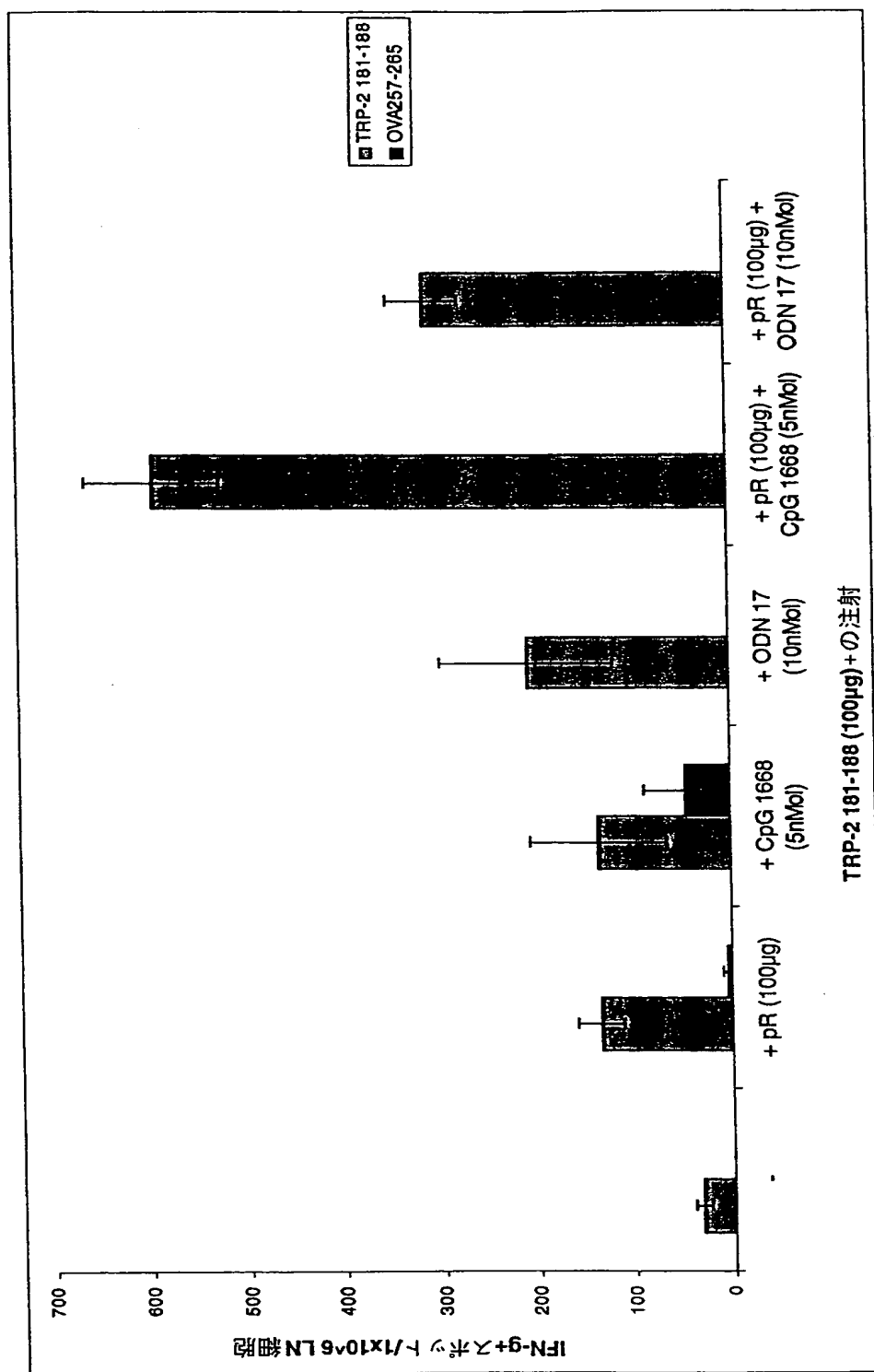
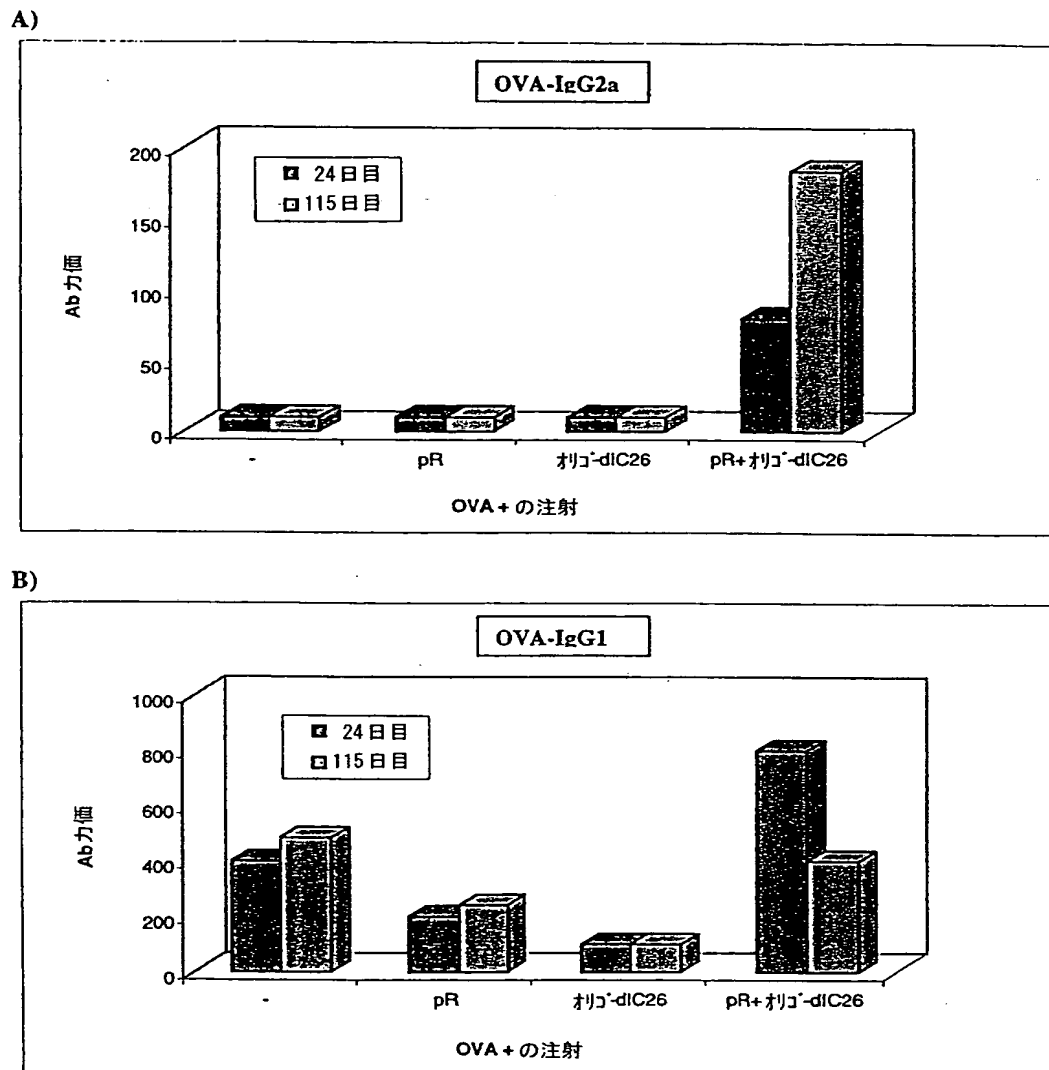


Fig. 8

【図9】

Fig. 9



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC17EP 01/06433
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/39 C07H21/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 906 092 A (HILLENAN MAURICE R ET AL) 16 September 1975 (1975-09-16) the whole document	1-17
X	US 5 691 136 A (KOEUTH THEARITH ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25) sequence listing	1-9
X	WO 92 11389 A (HOFFMANN LA ROCHE) 9 July 1992 (1992-07-09) table 8	1-9
X	WO 90 14424 A (SCRIPPS CLINIC RES) 29 November 1990 (1990-11-29) tables 1,2	1-9
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 October 2001		Date of mailing of the international search report 06/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bardini, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter-  
 of Application No  
 PCT/EP 01/06433

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAOYUKI MIURA ET AL.: "USE OF THE DEOXYINOSINE-CONTAINING PROBE TO ISOLATE AND SEQUENCE CDNA ENCODING THE FUSION (F) GLYCOPROTEIN OF SENDAI VIRUS (HWJ)" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 38, 1985, pages 271-274, XP000650050 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-9
X	GAMPER, H.B. ET AL.: "G/C-modified oligodeoxynucleotides with selective complementarity: synthesis and hybridization properties" NUCLEIC ACIDS RES. vol. 24, no. 13, 1996, pages 2470-5, XP002180912 the whole document	1-9
A	WO 98 16247 A (CARSON DENNIS A ;RAZ EYAL (US); ROMAN MARK (US); UNIV CALIFORNIA ()) 23 April 1998 (1998-04-23) cited in the application	

Form PCT/IB/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Info  
 not Application No  
 PCT/EP 01/06433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3906092	A	16-09-1975	NONE
US 5691136	A	25-11-1997	AT 198773 T 15-02-2001 AU 2931692 A 21-05-1993 CA 2121696 A1 29-04-1993 DE 69231646 D1 22-02-2001 DE 69231646 T2 13-06-2001 DK 610396 T3 29-01-2001 EP 0610396 A1 17-08-1994 ES 2152933 T3 16-02-2001 WO 9308297 A1 29-04-1993 US 5523217 A 04-06-1996
WO 9211389	A	09-07-1992	AT 150796 T 15-04-1997 AU 656549 B2 09-02-1995 AU 9136891 A 22-07-1992 CA 2075052 A1 22-06-1992 DE 69125368 D1 30-04-1997 DE 69125368 T2 09-10-1997 DK 515660 T3 28-07-1997 EP 0515660 A1 02-12-1992 ES 2101083 T3 01-07-1997 GR 3023863 T3 30-09-1997 WO 9211389 A1 09-07-1992
WO 9014424	A	29-11-1990	AU 651065 B2 14-07-1994 AU 5673390 A 18-12-1990 AU 643948 B2 02-12-1993 AU 5813890 A 18-12-1990 CA 2016841 A1 16-11-1990 CA 2016842 A1 16-11-1990 DE 69033648 D1 16-11-2000 DE 69033648 T2 10-05-2001 DE 69033650 D1 16-11-2000 DE 69033650 T2 10-05-2001 EP 1026239 A2 09-08-2000 EP 0472638 A1 04-03-1992 EP 0425661 A1 08-05-1991 GR 90100371 A ,B 10-10-1991 JP 5501348 T 18-03-1993 JP 4500607 T 06-02-1992 PT 94065 A ,B 08-01-1991 PT 94066 B 31-01-1997 WO 9014424 A1 29-11-1990 WO 9014430 A1 29-11-1990 US 6291159 B1 18-09-2001 US 6291160 B1 18-09-2001 GR 90100370 A ,B 31-03-1994 AU 652539 B2 01-09-1994 AU 5834490 A 18-12-1990 CA 2057923 A1 17-11-1990 EP 0478627 A1 08-04-1992 JP 4506600 T 19-11-1992 WO 9014443 A1 29-11-1990 US 6291158 B1 18-09-2001 US 6291161 B1 18-09-2001
WO 9816247	A	23-04-1998	AU 4992197 A 11-05-1998

Form PCT/IS4/210 (patent family annex) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 01/06433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9816247	A	EP 0930893 A1	28-07-1999
		JP 2001503254 T	13-03-2001
		WO 9816247 A1	23-04-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 カローラ・シュラック

オーストリア、アー1170ヴィーン、ツァイラーガッセ23/31番

(72) 発明者 アレーナ・エギエド

オーストリア、アー1130ヴィーン、ラフィテガッセ18-22/9番

Fターム(参考) 4C057 MM01

4C085 AA03 DD86 EE06 FF14

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02

MA04 NA06 ZB09

【要約の続き】

ンーまたはN-イソペンテニル-デオキシアデノシンよりなる群から選ばれた2'デオキシヌクレオシド、XはいずれもOまたはS、aおよびbは0~100の整数であり、ただしa+bは4~150である、BおよびEは核酸分子の5'末端または3'末端の一般的な基)の構造を有する免疫促進性のオリゴデオキシ核酸分子(ODN)、並びにそのようなODNを含む医薬組成物を記載する。